

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/24228 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 38/21, 35/76, A61P 43/00, 19/02, 19/08, 19/10, 29/00, C12Q 1/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08244
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 21 日 (21.09.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-286353 2000 年 9 月 21 日 (21.09.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷口 維紹 (TANIGUCHI, Tadatsugu) [JP/JP]; 〒112-0006 東京都文京区小日向1-18-26-B303 Tokyo (JP). 高柳 広 (TAKAYANAGI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒150-0032 東京都渋谷区鶯谷町16-5 Tokyo (JP). 中村 耕三 (NAKAMURA, Kozo) [JP/JP]; 〒179-0081 東京都練馬区北町2-23-13 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF REGULATING OSTEOCLAST FORMATION

(54) 発明の名称: 破骨細胞形成を制御する方法

(57) Abstract: A method of regulating an osteoclast formation signal. It is found out that the osteoclast formation process can be inhibited by activating II type IFN signal transduction. By activating the II type IFN signal, the expression of TRAF6 protein induced by RANKL is down-regulated and thus the formation of osteoclasts is inhibited. II type IFN (IFN- $\gamma$ ) shows an effect of dose-dependently inhibiting osteoclast formation. It is found out that a signal mediated by Stat1 is important in the inhibition of osteoclast formation by II type IFN. Thus, a novel therapeutic strategy against diseases in association with abnormal bone disruption involving autoimmune arthritis can be provided.

(57) 要約:

本発明は、破骨細胞形成シグナルを制御する方法を提供する。II型IFNシグナル伝達を活性化することにより、破骨細胞形成の過程を抑制できることを見出した。II型IFNシグナルの活性化により、RANKLにより誘導されるTRAF6蛋白質の発現がダウンレギュレートされ、破骨細胞形成が抑制された。II型IFN (IFN- $\gamma$ ) は、用量依存的に破骨細胞形成を抑制する作用を示した。II型IFNによる破骨細胞形成抑制には、Stat1を介するシグナルが重要であることが判明した。本発明により、自己免疫性関節炎を含む、病的骨破壊を伴う疾患に対する多くの新たな治療戦略が提供される。



WO 02/24228 A1



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 破骨細胞形成を制御する方法

#### 技術分野

本発明は破骨細胞形成シグナルを制御する方法に関する。より具体的には、破骨細胞形成を制御する方法に関する。

#### 背景技術

骨量は、骨芽細胞性骨形成 (osteoblastic bone formation) と破骨細胞性骨吸収 (osteoclastic bone resorption) の協調的なバランスの上に維持されている。骨吸収の異常は、骨粗鬆症、骨関節炎、転移性骨癌、ならびに慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) および歯周病などの炎症性骨疾患を含む様々な骨代謝疾患に関与している。従って、破骨細胞による骨吸収を効果的に調節することが極めて重要である。しかしながら、病的骨吸収を制御できる有効な治療法は確立されていない。

免疫応答は宿主にとって重要な防御機構であるが、免疫系は骨吸収にも関与しており、ある種の自己免疫状態などで見られる長期にわたる異常な活性化は、エフェクター細胞による組織破壊を引き起こすことがある (Roodman, G. D., Exp. Hematol. 27, 1229-41 (1999); Suda, T. et al., Endocrine Rev. 20, 345-57 (1999))。例えば自己免疫性関節炎においては、破骨細胞による骨吸収の増強により深刻な骨破壊が進み、進行性の関節破壊がもたらされる (Kong, Y. Y. et al., Nature 402, 304-9 (1999); Takayanagi, H. et al., J. Clin. Invest. 104, 137-46 (1999))。このような関節組織では、T細胞におけるRANKLの発現が重要な役割を果たしている。RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand, 別名 TRANCE/OPGL/ODF) は破骨細胞形成に必須のTNFファミリー因子であり、in vitro に

において活性化T細胞がRANKLを産生して破骨細胞形成を誘導することが報告されている (Kong, Y. Y. et al., Nature 397, 315-23 (1999); Kong, Y. Y. et al., Nature 402, 304-9 (1999); Horwood, N. J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 265, 144-50 (1999)). しかしながら、活性化T細胞が、RANKLの作用を相殺することにより骨のホメオスタシスの維持に関与する作用を持つことは知られていない。RANKLに加え、T細胞で発現する他の免疫調節因子も破骨細胞形成を調節しているが (Roodman, G. D., Exp. Hematol. 27, 1229-41 (1999); Suda, T. et al., Endocrine Rev. 20, 345-57 (1999); Takahashi, N. et al., J. Immunol. 137, 3544-9 (1986))、その調節の分子機構は知られていない。

### 発明の開示

本発明は、破骨細胞形成シグナルを制御する方法を提供することを課題とする。本発明の方法により、破骨細胞形成を制御することができる。具体的には、本発明は破骨細胞形成に関与するRANKLシグナル伝達の作用を制御する方法を提供する。さらに本発明は、破骨細胞形成に関与するTRAF6の発現もしくはその機能、またはその両方を制御する方法を提供する。本発明により、骨吸収および骨破壊を制御することが可能となる。また本発明は、これらの制御に用いるための薬剤を提供することを課題とする。また本発明は、破骨細胞形成または骨破壊を制御するための医薬を提供することを課題とする。

本発明者らは、破骨細胞形成の調節機構にII型インターフェロン (interferon; IFN) を介したシグナル伝達に関与している可能性を検証するため、IFN- $\gamma$  受容体 (IFN- $\gamma$ R) の成分の1つであるIFNGR1を欠損したマウス (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> マウス) を用いてエンドトキシンによる骨吸収の誘導を行い、II型IFNシグナルの欠損が及ぼす破骨細胞形成への影響を調べた。その結果、IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> マウスは、野生型マウスに比べ破骨細胞形成が増強され、骨破壊の顕著な増悪化が起こることを見出し

た。最近、自己免疫性関節炎において、活性化T細胞がRANKLの発現を通して破骨細胞形成を促進し、骨消失を調節していることが報告されている (Kong, Y. Y. et al., Nature 402, 304-9 (1999))。これに対し本発明者らの得た知見は、活性化T細胞が、IFN- $\gamma$ の産生を通して破骨細胞形成を負に調節する能力も保持していることを示すものである。すなわち、T細胞によるRANKLおよびIFN- $\gamma$ の発現のバランスが、破骨細胞形成の調節および骨組織の維持に重要であることが判明した。

IFN- $\gamma$ 産生T細胞が破骨細胞形成に及ぼす影響を調べるため、次にin vitro破骨細胞形成系において活性化T細胞の影響を調べた。具体的には、in vitroにおいて破骨細胞前駆細胞である骨髄単球・マクロファージ系前駆細胞 (bone marrow monocyte/macrophage precursor cells; BMMs) をM-CSF存在下でRANKLで刺激して破骨細胞形成を誘導する系において、BMMを活性化T細胞と共培養する実験を行った。その結果、抗CD3抗体で活性化させたT細胞と共にBMMを共培養した場合には、BMMの破骨細胞形成は強く阻害されることが判明した。IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>由来のBMMを用いた場合、活性化T細胞による破骨細胞形成の阻害効果は失われた。また、活性化T細胞の培養上清は、BMMの破骨細胞形成を阻害する作用を示したが、この阻害効果は抗IFN- $\gamma$ 抗体により中和されることが確認された。これらの結果から、IFN- $\gamma$ はRANKLにより誘導される破骨細胞形成を抑制することが明らかとなった。RANKLによるBMMの破骨細胞形成は、活性化T細胞の代わりに組み換えIFN- $\gamma$ を用いた場合でも阻害され、過剰量のRANKL存在下においても、極めて低いレベルのIFN- $\gamma$ が破骨細胞形成を強く阻害した。

IFN- $\gamma$ による破骨細胞形成阻害のシグナル伝達経路をさらに詳細に調べるため、IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>、Stat1<sup>-/-</sup>、またはIRF-1<sup>-/-</sup>マウス由来のBMMを用いて、RANKLによる破骨細胞形成に及ぼすIFN- $\gamma$ の効果を検証した。その結果、IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>マウスまたはStat1<sup>-/-</sup>マウスでは、IFN- $\gamma$ による破骨細胞形成の抑制能が顕著に低下したが、IRF-1<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと同様のIFN- $\gamma$ による阻害効果が観察された。この事実は、Stat1 (signal transducer and activator of transcription-

1) を介するシグナル伝達の活性化が、破骨細胞形成の抑制に本質的な役割を果たすことを示している。このことから、RANKLシグナル伝達経路のIFN- $\gamma$ による抑制には、Stat1 (GAF) を介し、IRF-1に非依存的な遺伝子誘導経路が重要であることが示された。

RANKLがその受容体であるRANKを刺激すると、RANKはアダプター蛋白質であるTRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) ファミリーを誘導し、NF (nuclear factor)- $\kappa$ B および JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) 経路を活性化する (Dougall, W. C. et al, Genes Dev. 13, 2412-24 (1999); Hsu, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 3540-5 (1999))。RANKLで誘導されるNF- $\kappa$ BとJNKの活性化を、IFN- $\gamma$ 処理したBMMにおいて調べたところ、NF- $\kappa$ BおよびJNK両者の活性化は IFN- $\gamma$ により阻害されることが判明した。また、RANKシグナル伝達経路の下流のエフェクター分子であるTRAF6の発現が、IFN- $\gamma$ により顕著に低下することが見出された。BMMにおいてTRAF6遺伝子を外来的に導入して強制発現させたところ、このBMMはIFN- $\gamma$ による破骨細胞形成の阻害に対して抵抗性を示し、RANKL刺激によりNF- $\kappa$ BおよびJNKの活性化が起こり破骨細胞への分化が誘導された。これらの分化した細胞はカルシトニン受容体を発現し、象牙 (dentin) 切片上で骨吸収活性を示した。これらの結果は、IFN- $\gamma$ による破骨細胞形成の抑制の少なくとも一部が、TRAF6発現の低下を介していることを示している。

本発明は、T細胞の活性化において、IFN- $\gamma$ が石灰化組織の破壊を保護するという、IFN- $\gamma$ の新たな生物学的機能を明らかにする。本発明により得られた知見は、破骨細胞の形成は、RANKLとIFN- $\gamma$ との間のバランスによって調節されていることを示している。IFN- $\gamma$ 受容体欠損マウスで観察されたコラーゲン誘導関節炎 (CIA) における所見 (Manoury-Schwartz, B. et al., J. Immunol. 158, 5501-6 (1997); Vermeire, K. et al., J. Immunol. 158, 5507-13 (1997)) は、破骨細胞分化に対するこのIFN- $\gamma$ の抑制効果により、少なくとも部分的に説明すること

が可能である。例えば、エンドトキシン誘導性の骨吸収モデルで見られるように、急性免疫反応期においてはIFN- $\gamma$ 産生が増強され、RANKLの発現増加を相殺して異常な破骨細胞形成は抑制されると考えられる。これに対し、慢性関節リウマチにおける慢性滑膜炎においては、このバランス作用はRANKL発現の方に傾くと思われる。これに関して、関節炎を起した関節には、有意なT細胞の浸潤が見られるにもかかわらずIFN- $\gamma$ の発現は抑制されており (Firestein, G. S. & Zvaifler, N. J., *Arthritis Rheum.* 33, 768-73 (1990); Kinne, R. W. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1360, 109-41 (1997))、一方、RANKLの発現は増強されている (Takayanagi, H. et al., *Arthritis Rheum.* 43, 259-69 (2000); Gravallesse, E. M. et al., *Arthritis Rheum.* 43, 250-8 (2000)) ことは注目に値する。すなわち、IFN- $\gamma$ の欠乏とRANKLの発現増強が、関節炎における破骨細胞形成の活性化に貢献していると考えられる。従って、この関節の破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進させることによって、破骨細胞の異常形成を抑制し、骨破壊を防止することが可能となる。

また本発明により、IFN- $\gamma$ を介する破骨細胞形成の抑制において、TRAF6は重要な標的分子であることが示された。これは、炎症性骨疾患を含む病的骨吸収に対する特異的治療薬開発にとって、TRAF6を標的とした薬剤を開発することが極めて重要であることを示している。

本発明により、以下のような骨代謝疾患に対する新たな治療的アプローチが可能となる。

- 1) 破骨細胞の生成および活性の制御は骨代謝疾患の予防および治療に有効である。特に自己免疫性関節炎に対して効果を有する。
- 2) RANKLシグナル伝達経路の阻害は、自己免疫性関節炎を含む骨代謝疾患における有効な治療戦略となる。
- 3) TRAF6は、自己免疫性関節炎を含む骨代謝疾患の予防および治療における有効な標的分子である。

4) II型IFN (例えばIFN- $\gamma$ ) は自己免疫性関節炎を含む骨代謝疾患の予防および治療に有効である。

このように本発明者らは、破骨細胞形成の新規な調節機構を解明し、破骨細胞による異常な骨吸収を制御する方法を開発するに至った。すなわち本発明は、破骨細胞形成シグナルを制御する方法、並びに該制御に用いるための薬剤および医薬に関し、より具体的には、

(1) 破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進または抑制する工程を含む、破骨細胞形成シグナルを制御する方法、

(2) 破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進または抑制する工程を含む、下記 (a) から (d) のいずれかを制御する方法、

(a) 破骨細胞形成

(b) RANKシグナル伝達

(c) TRAF6発現またはその機能

(d) 骨吸収

(3) 破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進する工程を含む、炎症性骨破壊の抑制方法、

(4) II型IFNシグナル伝達がStat1を介するシグナル伝達である、(1) から (3) のいずれかに記載の方法、

(5) II型IFNシグナル伝達の促進または抑制が、II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進または抑制である、(1) から (3) のいずれかに記載の方法、

(6) II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進を、下記 (a) または (b) に記載の工程により行う、(5) に記載の方法、

(a) II型IFN受容体リガンドの投与

(b) II型IFN受容体リガンドを発現するベクターの投与

(7) リガンドがIFN- $\gamma$ である、(5) または (6) に記載の方法、



(8) (1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収に及ぼす化合物の効果を検出する方法であって、

(a) 被検化合物を含む試料の存在下で、破骨細胞前駆細胞における RANKシグナル伝達、並びにII型IFNシグナル伝達を促進する工程、

(b) (1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収を検出する工程、を含む方法、

(9) (1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物を含む試料の存在下で、破骨細胞前駆細胞における RANKシグナル伝達、並びにII型IFNシグナル伝達を促進する工程、

(b) (1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収を検出する工程、

(c) 対照の条件下に比べ、該(1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収を調節する化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) II型IFNシグナル伝達がStat1を介するシグナル伝達である、(8)または(9)に記載の方法、

(11) II型IFNシグナル伝達の促進が、II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進である、(8)または(9)に記載の方法、

(12) II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進を、下記(a)または(b)に記載の工程により行う、(11)に記載の方法、

(a) II型IFN受容体リガンドの投与

(b) II型IFN受容体リガンドを発現するベクターの投与

(13) リガンドがIFN- $\gamma$ である、(11)または(12)に記載の方法、

(14) II型IFN受容体リガンドまたは該リガンドを発現するベクターを含む、下

記 (a) から (d) のいずれかに記載の薬剤、

(a) 破骨細胞形成抑制剤

(b) RANKシグナル伝達抑制剤

(c) TRAF6抑制剤

(d) 骨吸収抑制剤

(15) II型IFN受容体のリガンドがIFN- $\gamma$ である、(14)に記載の薬剤、

(16) II型IFN受容体リガンドまたは該リガンドを発現するベクターを含む、骨破壊を抑制するための医薬組成物、

(17) 自己免疫性関節炎における骨破壊の予防または治療に用いられる、(16)に記載の医薬組成物、に関する。

本発明は II型IFNシグナル伝達を促進または抑制することにより、破骨細胞形成シグナルを制御する方法に関する。本発明において「破骨細胞形成シグナル」とは、破骨細胞形成を誘導する過程および破骨細胞形成により誘導される過程における作用または該作用の一部を指す。これらの作用には、遺伝子の発現、細胞の形態および機能変化を含む表現型の変化、ならびにこれらの表現型の変化により引き起こされる代謝活動などが含まれる。II型IFNシグナル伝達を促進することによって、破骨細胞形成シグナルは阻害され骨吸収が抑制される。逆にII型IFNシグナル伝達を抑制することによって、破骨細胞形成シグナルの阻害が低下し骨吸収が促進される。

破骨細胞は、造血幹細胞を起源とするマクロファージ・単球系細胞 (CFU-M) より分化した単核の破骨細胞前駆細胞が融合して形成される多核巨細胞である (Udagawa, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7260, 1990)。一般に成熟した破骨細胞は、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP)、カルシトニン受容体、ヴィトロネクチン受容体、および M-CSF受容体 (c-Fms) を発現し、骨吸収能を示す。破骨細胞形成は、これらの指標の少なくとも1つをもとに判断すること

ができる。in vitro培養系において、骨髓単球・マクロファージ系前駆細胞 (bone marrow monocyte/macrophage precursor cells; BMMs) は、M-CSF (macrophage-colony stimulating factor; マクロファージコロニー刺激因子) 存在下で RANKL の刺激により破骨細胞に分化する。これらの因子以外にも、炎症性関節炎などにおける骨破壊には、IL (interleukin)-1、IL-6、TNF (tumour necrosis factor)- $\alpha$ 、FGF (fibroblast growth factor)-2、および PDGF (platelet-derived growth factor) などのサイトカインや増殖因子が関与している。破骨細胞が骨吸収を行う際には、明帯 (clear zone) と呼ばれるアクチンに富んだ部位で骨に接触し、波状縁 (ruffled border) という膜陥入構造を形成し、プロトンポンプによる酸性環境下でマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、カテプシンなどの基質分解酵素を自ら産生することにより骨基質が分解される。本発明によれば、このような破骨細胞の分化および骨吸収などを誘導する破骨細胞形成シグナルを、II型IFNシグナル伝達の調節により制御することができる。すなわち、II型IFNシグナル伝達を促進することにより骨破壊を抑制し、逆にII型IFNシグナル伝達を抑制することによって、骨破壊を促進することができる。

また、上記のように、一般に破骨細胞の形成は、M-CSF存在下、RANKL により誘導される。RANKL は細胞表面に発現する RANK (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) のリガンドであり、RANK を介したシグナル伝達を誘導する。RANK の活性化により、シグナルは TRAF2、TRAF6、および他の TRAFファミリー因子を含むエフェクター分子を介して下流に伝達され、破骨細胞への分化および活性化を促し破骨細胞を形成させる。破骨細胞の形成には、RANKL 以外に TNF  $\alpha$  および IL-1 も関与しており、TNF  $\alpha$  は I型およびII型TNF受容体を介して、また IL-1 は IL-1受容体を介して破骨細胞形成シグナルを伝達する。また、TRAFファミリー因子は、TNF受容体および IL-1受容体を介するシグナルにも関与しており、例えば TRAF6 は IL-1受容体のアダプター分子としても機能する。II型IFNシグナル伝達を促進または抑制することにより、これらの破骨細胞形成シグナルをそれぞれ抑

制または促進することが可能である。

実施例 2 に示されるように、II型IFNシグナル伝達を促進または抑制することにより、特に RANKシグナル伝達を効果的に制御することができる。M-CSFに依存するBMMの増殖に対しては、IFN- $\gamma$ は比較的穏やかな抑制効果を示す一方、RANKシグナルにより誘導される破骨細胞形成は、極めて低いレベルのIFN- $\gamma$ でも強い阻害作用を示した(図 3)。さらにIFN- $\gamma$ は、M-CSFおよびRANKLに依存して分化するBMMsの破骨細胞形成を阻害するのみならず、M-CSF非依存性のマクロファージ細胞株RAW264.7のRANKLによる破骨細胞形成も阻害する。これらの知見は、II型IFNシグナル伝達を促進することにより、RANKシグナル伝達を特に選択的に抑制することができることを示している。逆にII型IFNシグナル伝達を抑制することにより、RANKシグナル伝達の阻害を低下させることができる。「RANKシグナル伝達」とは、RANKを介した一連のシグナル伝達またはその一部を指し、RANKの下流のシグナル分子の活性化や発現の上昇、標的遺伝子発現の誘導、RANKの活性化により引き起こされる細胞の形質変化などを含む。これらには、TRAF6の発現上昇、TRAF6の活性化、TRAF6を介するシグナル伝達、NF- $\kappa$ Bの活性化、JNKの活性化(リン酸化)を含む MAPKシグナル伝達の活性化が挙げられる。またこれらには、破骨細胞形成、並びに TRAP、カルシトニン受容体、およびヴィトロネクチン受容体等の破骨細胞で発現される遺伝子の発現誘導、さらには骨吸収能の獲得などが挙げられる。

また、実施例 3 に示されるように、II型IFNシグナル伝達の促進は、TRAF6の発現を顕著に阻害することが判明した。イムノブロット解析の結果は、II型IFNシグナル伝達の促進が、TRAF6蛋白質レベルを有意に低下させることを示している(図 6c)。従って、II型IFNシグナル伝達を促進することにより、RANKシグナルによるTRAF6発現を抑制することが可能である。TRAF6の発現を抑制することによりTRAF6の機能は抑制される。TRAF6の機能としては、例えばTRAF6が関与するシグナル伝達が増えられ、すなわち、II型IFNシグナル伝達を促進することにより、TRAF6が関与するシグナル伝達を抑制することができる。TRAF6はRANKシグナル伝達以外

にも、CD40、p75NTR、および Toll/IL-1受容体ファミリーのシグナル伝達にも関与していることが示唆されている。例えば、TRAF6 は TLR (Toll-like receptor)-2 や TLR-4 などを含む LPS/エンドトキシンシグナルにも関与している。本発明の方法を用いてTRAF6発現を制御することにより、これらの TRAF6を介するシグナル伝達を制御し得る。TRAF6の発現または機能を阻害する方法が、破骨細胞を抑制する創薬の際の1つの代替戦略ともなることが示唆される。

本発明において「II型IFNシグナル伝達」とは、II型IFNにより誘導されるシグナル伝達またはその一部を言う。すなわち、II型IFNにより誘導されるシグナル伝達、II型IFN受容体の活性化により誘導されるシグナル伝達、およびII型IFN受容体の下流のエフェクター分子により誘導されるシグナル伝達などは、II型IFNシグナル伝達に含まれる。本発明においてII型IFNシグナル伝達は、好適には、II型IFN受容体の活性化により誘導されるシグナル伝達を言う。

II型IFNとしては IFN- $\gamma$ が挙げられ、IFN- $\gamma$ はII型IFN受容体 (IFN- $\gamma$ R) のリガンドとして機能してII型IFNシグナル伝達を活性化する。II型IFN受容体に IFN- $\gamma$ 等のリガンドが結合すると、II型IFN受容体は JAKファミリー (JAK1およびJAK2等) のチロシンキナーゼの活性化を通して Statファミリー (Stat1等) がリン酸化される。Stat1ダイマーは GAF (IFN- $\gamma$  activated factor) と呼ばれ、このリン酸化されたダイマーが核に移行し GAS (IFN- $\gamma$  activated sequence) に結合して標的遺伝子群の転写を促進する。このように、II型IFNシグナル伝達としては、Stat1 (GAF) を介するシグナル伝達が挙げられる。また、IRF-1もIFN- $\gamma$ の標的遺伝子の発現を増強する。

II型IFNシグナル伝達を活性化するには、例えばII型IFN受容体のリガンドを作用させる。II型IFN受容体リガンドとしては、IFN- $\gamma$ が挙げられる。また、IRF-1の発現によりIFN- $\gamma$ 発現を誘導してもよい。また、II型IFN受容体の下流のシグナル伝達を活性化することもできる。なかでも、Stat1を介するシグナル伝達を促進することが好ましい。例えば、GAF活性化を促進することにより、II型IFNシグナ

ル伝達を活性化することができる。また、GAS応答性の遺伝子群の発現を促進することにより、II型IFNシグナル伝達を活性化することもできる。

II型IFNシグナル伝達を抑制するには、例えばII型IFN受容体のリガンドを取り除いたり、リガンドと受容体との結合を阻害する。例えば、リガンドに対する抗体を投与することによりリガンドを中和することができる。また、IFN- $\gamma$ 発現を抑制する因子、すなわち他のサイトカイン（IL-4、IL-10を含む）などや、転写抑制因子によりIFN- $\gamma$ 発現を抑制してもよい。また、II型IFN受容体の下流のシグナル伝達を抑制してもよい。

また、例えば活性化型JAKを細胞で発現させるなど、細胞内におけるJAKファミリーのチロシンキナーゼ活性を上昇させることにより、Stat1の二量体化を促進してII型IFNシグナルを促進することも可能である。逆にJAKを阻害すればII型IFNシグナルを抑制することができる。また、Stat1は核内でCBP/p300等の転写コアクチベーターと結合して転写活性が促進される。そこで、CBP/p300等を過剰発現したり、これらとStat1との結合能を高めれば、II型IFNシグナルは亢進する。逆に、CBP/p300等とStat1との結合を阻害すれば、II型IFNシグナルを阻害することができる(Horvai, A. E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1074-1079 (1997))。

II型IFNシグナル伝達の制御を行う標的となる細胞は、破骨細胞前駆細胞である。本発明において「破骨細胞前駆細胞」とは、破骨細胞に分化し得る細胞を指す。このような細胞としては、破骨細胞に分化し得るマクロファージ・単球系細胞等が含まれる。具体的には、骨髓マクロファージ系細胞や滑膜マクロファージなどの、骨軟骨組織に存在するマクロファージ系細胞（例えばマクロファージ・単球系前駆細胞など）などが挙げられる。また、造血幹細胞なども含まれる。細胞が由来する生物種に特に制限はない。RANKLシグナル伝達系およびII型IFNシグナル伝達系は、哺乳動物において広く保存されており、ヒト細胞等においても、これらのシグナル分子群はマウス細胞と共通しており、その機能についても同様で

あることが知られている。従って、例えばヒトおよびサルを含む霊長類に由来する破骨細胞前駆細胞に対して、本発明に従いII型IFNシグナル伝達の制御を行うことにより、該細胞の破骨細胞形成を制御することが可能である。

例えば、ヒト末梢血単核細胞からのin vitro破骨細胞形成におけるIFN- $\gamma$ の効果を調べるには、健常者から末梢血を採取し、RPMI 1640で1:1に希釈し、フィコール/プラークに重層して400gで30分間遠心する。単離した末梢血単核細胞 ( $10^6$ 細胞/ウェル) を24ウェルのマルチウェルプレートに加える。これらの細胞は20%ウマ血清を含む $\alpha$ -MEM中、100ng/ml RANKLおよび10ng/ml M-CSFの存在下、かつ組み換えヒトIFN- $\gamma$ の存在下または非存在下で10日間培養し、ヒト破骨細胞形成を検出することにより実施することができる。

II型IFN受容体のリガンドとは、II型IFN受容体に結合して受容体を活性化させる分子を指す。II型IFN受容体のリガンドを用いてシグナル伝達を促進する場合、用いられるII型IFN受容体のリガンドとしては、該受容体に結合し、受容体を活性化させる限り特に制限はない。リガンドには天然のリガンド、天然のリガンドの誘導体、リガンドとして作用する他の蛋白質、および人工的なリガンド等が含まれる。リガンドは蛋白質またはペプチドであっても、非ペプチド性化合物であってもよい。ペプチド性のリガンドは、組み換え体であってよく、また、修飾されていてもよい。また、リガンドは製剤化されたものであってもよい。また、グリコール結合体 (glycol-conjugated IFN) など、他の化合物と結合したものであってもよい。

II型IFN受容体のリガンドとしては例えば IFN- $\gamma$ が挙げられる。また、その誘導体も含まれる。本発明においてIFN- $\gamma$ には、野生型IFN- $\gamma$ のみならず、野生型分子の誘導体も含まれる。例えば、野生型IFN- $\gamma$ に1または複数のアミノ酸を付加、欠失、置換、および/または挿入した蛋白質や、主鎖または側鎖が修飾された蛋白質なども、本発明においてIFN- $\gamma$ に含まれる。またIFN- $\gamma$ には、全てのIFN- $\gamma$ 型サブタイプ、およびIFN- $\gamma$ 様活性を示す誘導体などが含まれる。

これらのII型IFN受容体リガンドを投与して、II型IFN受容体にリガンドを相互作用させることにより、II型IFNシグナル伝達を促進することができる。リガンドの投与は、標的細胞の受容体に結合し得るように、適宜公知の投与方法に従って行えばよい。

リガンド自体を用いる代わりに、リガンドを発現するベクターを用いることも考えられる。ペプチド性のリガンドは、これをコードする核酸を発現させることにより產生させることができる。例えば IFN- $\gamma$  またはこれらの派生体などを発現するベクターを細胞に導入すれば、導入細胞から產生されたこれらの分子がII型IFN受容体に結合してII型IFNシグナルを活性化する。本発明においてベクターは、II型IFN受容体リガンドを発現することができる限り制限はなく、DNAおよびRNAを含むポリヌクレオチド自体、および該ポリヌクレオチドを含む複合体の形態であってよい。リガンドを発現するベクターの作製には、プラスミドベクターおよびウイルスベクターを含む公知のベクター系を用いることができる。ウイルスベクターとしては、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどが挙げられる。生体へのベクターの投与は、直接ベクターを投与する *in vivo* 法、またはベクターを導入した細胞を投与する *ex vivo* 法により行うことができる。

*ex vivo* 法により遺伝子を導入する場合、例えばレトロウイルスベクターを好適に用いることができる。レトロウイルスベクターは、導入遺伝子を宿主染色体に組み込むため、長期間安定した発現が期待できる。例えば関節に対する遺伝子導入においては、体外に取り出した滑膜細胞に対して遺伝子導入を行い、遺伝子が導入された細胞を再び関節に移植することが考えられる。*in vivo* 法により遺伝子を導入する場合、例えばアデノウイルスベクターを用いることができる。アデノウイルスは高濃度に濃縮が可能であり、導入遺伝子がホストのゲノムに組み込まれないため安全性も高い。実際に、滑膜細胞に対してのアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率は高いことが報告されており、関節に対する遺伝子導入に用い



ることが可能である。その他、naked DNAの投与や、センダイウイルスリポソームを用いた方法などにより、非ウイルスベクターを用いた細胞または生体への遺伝子導入を行うこともできる。ベクターを投与する対象となる細胞は特に制限はない。ベクターやベクターを導入した細胞は、生産されたりリガンドが破骨細胞前駆細胞に作用し得るように投与される。例えば骨軟骨部位へ局所投与することができる。

また、ベクターを導入した細胞に限らず、II型IFN受容体のリガンドを産生する細胞であれば、この細胞を投与することも考えられる。本発明におけるII型IFN受容体リガンドの投与には、そのリガンドを産生する細胞の投与などのリガンドの間接的な投与も含まれる。天然にIFNを産生する細胞としては、IFN- $\gamma$ であればT細胞、NK細胞、およびNKT細胞などのリンパ球が挙げられる。

また、体内にあるII型IFN産生細胞からのII型IFN産生を促進することにより、II型IFNシグナル伝達を促進することもできる。このためには、II型IFN産生細胞からのIFN産生を促進する刺激を与えればよい。実施例に示すように、活性化されたT細胞はIFN- $\gamma$ を放出して破骨細胞の形成を抑制した。従って、例えばT細胞を活性化させることにより、IFN- $\gamma$ 産生を促進させることができる。一般にII型IFN産生は、ウイルスや微生物の感染、エンドトキシン、合成低分子、抗生物質、多糖体、核酸、マイトジェン、免疫増強剤の投与などによって誘導される(Mayer, E. D. et al., "Interferons and Other regulatory cytokines" (インターフェロンおよび他の調節性サイトカイン), 1998, John Wiley & Sons)。

以上のような方法により、II型IFN受容体リガンドを受容体に相互作用させれば、破骨細胞前駆細胞においてRANKLなどにより誘導される破骨細胞形成が阻害され、骨吸収を抑制することができる。本発明の方法によれば、例えば自己免疫性関節炎における骨破壊を抑制することができる。骨破壊を抑制する対象となる個体に制限はなく、例えばヒト、およびマウス、ラット、ウサギ、サルなどの非ヒト哺乳動物が挙げられる。非ヒト哺乳動物への適用は、ヒト骨破壊性疾患に対する

予防法または治療法を開発するためのモデルとする上でも有用である。これにより、例えば自己免疫性関節炎における骨破壊を予防する新たな方法を開発することができる。

例えば、個体を用いてIFN- $\gamma$ の破骨細胞形成抑制の効果を解析するには、実施例1に記載したような炎症性骨破壊のエンドトキシン誘導モデルを利用することができる。具体的には、7～8週齢のマウス (n=20) の頭蓋冠に、リポ多糖 (LPS) (Sigma社) を 25mg/kg-体重で局所投与し、同じ部位に続く4日間にわたって組み換えIFN- $\gamma$  (例えば10000U/day) (n=10) または対照の生理食塩水 (n=10) を皮下投与することにより、IFN- $\gamma$ の局所注入の治療効果を検査することができる。LPS注入の5日後に、以前の記載に従って海綿骨梁の骨面のミリメートルあたりの破骨細胞数、および破骨細胞で覆われた骨面(侵食面)の割合を解析する (Chiang, C. Y. et al., Infect. Immun. 67, 4231-6 (1999))。

例えば炎症部位へのIFN- $\gamma$ 投与を毎日または間隔をおいて行うことにより、破骨細胞形成および骨吸収の阻害を検査することができる。これにより、骨破壊疾患におけるIFN- $\gamma$ の臨床適用の条件をより詳細に検討することが可能である。骨破壊は、複数の骨髓腫および転移性骨癌を含む腫瘍、並びに自己免疫性関節炎などの炎症状態にしばしば付随していることから、IFN- $\gamma$ は癌や関節炎で誘導される骨破壊に対する治療に特に効果を有する可能性がある。骨破壊部位へのIFN- $\gamma$ の局所送達投与量を低く抑えることができるため、副作用を低減することが可能である。

また、ヒト疾患における病的骨吸収に対するII型IFNの効果調べるには、慢性関節リウマチ患者由来の培養滑膜細胞からのin vitro破骨細胞形成の系を利用すればよい。この系は、リウマチ滑膜 (rheumatoid synovium) で観察される病的破骨細胞形成のex vivoモデルである (Takayanagi, H. et al. Arthritis Rheum., 43, 259 (2000))。滑膜組織を切り離し、1mg/ml コラゲナーゼ (Wako pure chemicals, Osaka, Japan) および0.15mg/ml DNaseI (Sigma, St. Louis, MO) を含むRPMI 1640

を20倍の容量加えて混合し、振盪しながら37°Cで90分間インキュベートする。細胞懸濁液を70mmのcell strainerを通して濾過し、最終的に20%ウマ血清 (Gibco BRL) を含む $\alpha$ -MEM中に細胞を懸濁する。単離した滑膜細胞 ( $10^6$  細胞/ウェル) は24ウェルのマルチウェルプレートに撒き、1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ( $10^{-7}$  M)および 2ng/ml 組み換えヒトM-CSFの存在下、かつ組み換えヒトIFN- $\gamma$ の存在下または非存在下で20日間培養する。3日おきに、培地の半分を交換する。このex vivo破骨細胞形成モデルにおいて、組み換えIFN- $\gamma$ の破骨細胞形成に対する抑制効果を検出することができる。このような方法により、II型IFNの局所的または全身的投与によりヒト骨疾患における骨吸収を抑制するための新たな戦略を開発することか可能である。

また、最近、蛋白質の機能抑制の方法の一つとして、抗体誘導療法や、DNAワクチンによる抗体誘導療法が開発されている。これらの免疫学的手法を用いて破骨細胞形成シグナルに関与する分子の機能を遮断することにより、骨吸収や骨破壊を制御することが可能である。本発明は、破骨細胞形成シグナルに関与する分子に対する抗体を誘導することにより、破骨細胞形成を調節する方法を提供する。好ましい一態様においては、RANKLシグナル伝達に関与する蛋白質に対する免疫反応を誘導することにより、破骨細胞形成の調節を行う。例えば、癌の骨転移やリウマチなどの病的骨破壊疾患一般に対して、RANKLシグナル伝達を行う蛋白質に対する免疫反応を誘導することにより、骨破壊を抑制するための抗体誘導療法を実施することができる。RANKLシグナル伝達に関与する蛋白質としては、例えばRANKL、RANK、TRAF6、c-Fos、NF- $\kappa$ B、JNK、Fra-1、およびFra-2などが挙げられるがこれらに制限されない。特に好ましい標的蛋白質としては、RANKLおよびRANKが挙げられる。

また、好ましい他の態様においては、II型IFNシグナル伝達に関与する蛋白質に対する免疫反応を誘導することにより、破骨細胞形成の調節を行う。II型IFNシグナルは破骨細胞形成に抑制的に働くことから、このシグナル伝達を抑制すること

により、破骨細胞形成を促進することができる。骨形成が亢進する病態に対してII型IFNシグナル伝達に関与する蛋白質に対する免疫療法を実施することにより、破骨細胞形成を促進して骨量の増加を抑制することが可能である。II型IFNシグナル伝達に関与する蛋白質としては、IFN- $\gamma$ などのII型IFN、その受容体、およびStat1などが挙げられるがこれらに制限されない。特に、IFN- $\gamma$ およびIFN- $\gamma$ 受容体は、免疫反応の誘導のための標的として好ましい。

破骨細胞形成シグナルに関与する蛋白質を標的とした免疫反応は、これらの蛋白質または抗原性を有する部分蛋白質を抗原として投与することにより誘導される。例えば、RANKLまたはRANKあるいはそれらの部分蛋白質を抗原として投与し、抗体を誘導する。抗原蛋白質は、適宜アジュバントと組み合わせて投与することができる。RANKLまたはRANKに対する免疫反応を誘導する方法を利用してRANKL-RANKの結合を抑制すること（抗RANKL抗体、抗RANK抗体の誘導療法を含む）により、破骨細胞形成は抑制され、骨吸収を低下させることができる。また、II型IFNまたはその受容体に対する免疫反応を誘導する方法を利用してII型IFN-II型IFN受容体の結合を抑制すること（抗II型IFN抗体、抗II型IFN受容体抗体の誘導療法を含む）により、破骨細胞形成の抑制が解除され、骨吸収を促進することができる。本発明は、このような阻害抗体の誘導法による骨吸収の制御により、病的骨破壊または骨形成を病態とする疾患に対する治療を行う方法を提供する。

また、破骨細胞形成を調節するために、抗体以外の可溶性因子を利用することも可能である。例えば、RANKLに対するデコイ受容体として知られるOPGは、RANKLとRANKの結合を阻害することによりRANKLシグナル伝達を遮断する。OPGが関節炎に対して治療効果を有することは、*in vitro* (Takayanagi, H. et al., *Arthritis Rheum.* 43, 259-269 (2000)) および*in vivo* (Kong, Y. Y. et al., *Nature* 402: 304-309 (1999)) で示されている。これらのデコイを利用すれば、破骨細胞形成に関わるRANKやII型IFN等のリガンドの作用を阻害することができる。デコイとして機能する蛋白質は、天然の可溶性受容体などを用いることもできるし、また、

膜結合型受容体の細胞外領域の部分蛋白質を製造して利用することもできる。例えば、RANKのリガンド結合領域を含む部分ペプチドによりRANKLを捕捉すれば、RANKLのRANKへの結合を阻害し、破骨細胞形成を抑制することができる。また、II型IFNに結合するデコイを用いれば、II型IFNシグナルを遮断して破骨細胞形成を促進することができる。また、リガンドに結合する蛋白質ではなく、受容体に結合するが受容体を活性化しない因子を用いてシグナルを遮断することもできる。このような因子は、リガンドの変異体や受容体結合部を含む部分ペプチドであってもよく、また非ペプチド性化合物などであってもよい。本発明は、デコイなどによりRANK-RANKL間、あるいはII型IFN-II型IFN受容体間の結合を阻害することにより、骨吸収を制御して病的骨破壊または骨形成を病態とする骨疾患に対する治療を行う方法に関する。また、生体が内因性に持つデコイに対する阻害抗体を上記のように誘導させれば、骨吸収をより多様に制御することも可能と考えられる。

II型IFNシグナル伝達の制御により破骨細胞形成シグナルを調節する方法を利用すれば、これに影響を与え得る化合物のアッセイ系やスクリーニング系を構築することができる。これらの系では、例えば破骨細胞形成、RANKシグナル伝達、TRAF6発現もしくはその機能、または骨吸収に対する調節を指標として、化合物の効果が検証される。例えば、被検化合物の存在下において、II型IFNシグナル伝達による上記の調節効果がどのように変化するかを調べれば、II型IFNシグナル伝達によるこれらの制御を促進または抑制する化合物を見出すことができる。

具体的には、(1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収に及ぼす化合物の効果を検出する方法は、

(a) 被検化合物を含む試料の存在下、破骨細胞形成を誘導し得る条件で破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進する工程、

(b) (1) 破骨細胞形成、(2) RANKシグナル伝達、(3) TRAF6発現もしくはその機能、または(4) 骨吸収を検出する工程、を含む方法である。

この検出における「破骨細胞を誘導し得る条件」とは、II型IFNシグナル伝達が活性化されなければ、破骨細胞形成が誘導される条件を指す。このような条件とは、例えば破骨細胞前駆細胞においてRANKシグナル伝達を促進する条件である。

この検出方法は、特にII型IFNシグナル伝達による（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収、の抑制に及ぼす化合物の促進または抑制効果を検出するために有用である。例えば、II型IFNシグナル伝達を促進する条件下においても、（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収が誘導されるならば、用いた被検化合物は、II型IFNシグナル伝達によるこれらの抑制作用を低下させる活性を有していると判断される。また、II型IFNシグナル伝達を促進する条件下において、被検化合物が、（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収の阻害をさらに上昇させるならば、用いた被検化合物は、II型IFNシグナル伝達によるこれらの抑制作用を上昇させる活性を有している可能性がある。さらにII型IFNシグナル伝達が阻害されている条件下で同様の検出を行えば、化合物の効果がII型IFNシグナルに依存しているのかを知ることができる。このような検出のためには、例えばII型IFNの中和抗体によりIFNを中和したり、実施例で用いられたような IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>の個体や細胞を用いることができる。

用いられる細胞は、破骨細胞に分化し得る細胞であれば制限はなく、例えば骨髄マクロファージ系細胞等が利用される。RANKシグナル伝達を促進するには、例えばRANKのリガンドであるRANKLを投与すればよい。IFNシグナルを活性化しなければ破骨細胞形成が誘導されるように、必要に応じて M-CSFや他のサイトカイン・増殖因子を投与する。II型IFNシグナル伝達を促進する方法は、上記した方法により行えばよい。具体的には、例えば INF- $\gamma$ などのII型IFN受容体リガンドを投与することができる。被検化合物を含む試料としては特に制限はなく、例えば、合成低分子化合物のライブラリー、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現

産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清などが挙げられる。

本発明の検出方法を用いれば、(1)破骨細胞形成、(2)RANKシグナル伝達、(3)TRAF6発現もしくはその機能、または(4)骨吸収を調節する化合物のスクリーニングを行うことができる。このスクリーニング方法は、

(a) 被検化合物を含む試料の存在下、破骨細胞形成を誘導し得る条件で破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進する工程、

(b) (1)破骨細胞形成、(2)RANKシグナル伝達、(3)TRAF6発現もしくはその機能、または(4)骨吸収を検出する工程、

(c) 対照の条件下と比べ、該(1)破骨細胞形成、(2)RANKシグナル伝達、(3)TRAF6発現もしくはその機能、または(4)骨吸収を調節する化合物を選択する工程、を含む方法である。

上記の検出方法と同様に、「破骨細胞を誘導し得る条件」とは、II型IFNシグナル伝達が活性化されなければ、破骨細胞形成が誘導される条件を指す。このような条件とは、例えば破骨細胞前駆細胞においてRANKシグナル伝達を促進する条件である。また、このスクリーニング方法は、上記の検出方法と同様に、II型IFNシグナル伝達による(1)破骨細胞形成、(2)RANKシグナル伝達、(3)TRAF6発現もしくはその機能、または(4)骨吸収、の抑制作用を上昇または低下させる化合物をスクリーニングするために利用できる。

対照の条件としては特に制限はないが、例えば被検化合物を含む試料の非存在下における場合が挙げられる。すなわち、上記の工程(c)において、被検化合物を含む試料の非存在下における場合と比べ、該(1)破骨細胞形成、(2)RANKシグナル伝達、(3)TRAF6発現もしくはその機能、または(4)骨吸収を上昇または低下させる化合物を選択することにより、これらを調節する化合物を得ることができる。また、対照の条件としては、破骨細胞形成、RANKシグナル伝達、TRAF6発現もしくはその機能、または骨吸収を調節し得る他の化合物の存在下における

場合を挙げることができる。このような態様も、工程（a）における被検化合物を含む試料の非存在下における場合に含まれる。この場合、上記の工程（c）において、対照の化合物の存在下における場合と比べ、該（1）破骨細胞形成、（2）RANKシグナル伝達、（3）TRAF6発現もしくはその機能、または（4）骨吸収を上昇または低下させる化合物を選択する。このようなスクリーニングにおいては、ある化合物に比べより高い効果を有する化合物を得ることができる。また、工程（c）において、工程（a）よりも低い用量の被検化合物を用いた場合を挙げることができる。これにより化合物の用量依存性が明らかとなる。

本発明の検出方法およびスクリーニング方法は、例えば実施例2に記載したような破骨細胞形成の *in vitro* アッセイ系を用いて行うことができる。具体的には、例えば、非接触性骨髄細胞（24穴プレートの1ウェル当たり $5 \times 10^5$  細胞）を10ng/mlのM-CSFを含む $\alpha$ 最小必須培地（ $\alpha$ -MEM）で2日間培養し、100ng/mlの可溶性RANKL、10ng/mlのM-CSF、さらに適当な濃度のIFN- $\gamma$ の存在下でさらに3日間培養して破骨細胞を形成させる系を利用できる。ここに被検化合物を含む試料を添加して培養する。また、*in vivo* の系であれば、例えば実施例で用いたようなエンドトキシン誘導性骨吸収動物モデルを用いた系が挙げられる。

破骨細胞形成は、例えば文献（Yasuda, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95, 3597-602 (1998)）に従って観察することができる。具体的には、例えば個体であれば、骨切片を作成して骨吸収を観察することができる。また、顕微鏡観察により多核巨細胞を同定したり、TRAP染色や、カルシトニン受容体またはヴィトロネクチン受容体の発現の検出などの公知の検出法により、*in vivo* および *in vitro* 両方で破骨細胞形成を検出することができる。RANKシグナル伝達であれば、例えば NF- $\kappa$ BやJNKの活性化などを実施例に記載の方法等により検出することができる。また、TRAF6発現であれば、TRAF6 mRNAの発現をノーザンブロットやRT-PCR等により検出したり、TRAF6蛋白質をイムノブロットや免疫沈降、ELISA等により検出することができる。TRAF6の機能であれば、例えば上記のRANKシグナル



伝達と同様、NF- $\kappa$ BやJNKの活性化などにより検出することができる他、先に記載したように、CD40、p75NTR、または Toll/IL-1受容体ファミリーなどTRAF6を介する他のシグナル伝達の活性化を検出することによって評価することもできる。例えばJNKに限らず、MAPキナーゼ経路の他のシグナル分子のリン酸化を指標としてもよく、また、TRAF6に結合するTAK1またはECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways) などの分子との結合や修飾を指標とすることも考えられる。骨吸収であれば、例えば象牙切片上での骨吸収活性を公知の方法により検出することができる。

この検出の結果、被検化合物を含む試料の添加により、対照の条件下（例えば試料非存在下で検出した場合など）と比較して（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収が有意に促進または抑制されていれば、用いた被検試料は II型IFNシグナル伝達によるこれらの制御を調節する化合物の候補となる。このスクリーニング方法により単離される化合物は、破骨細胞形成を制御するために有用であり、骨代謝疾患の予防薬や治療薬の開発の上でも有用である。

スクリーニングにより選択された医薬候補化合物は、上記本発明の検査方法を用いて、臨床適用のための詳細な投与条件を決定することができる。すなわち、上記検査方法を用いて投与量、投与間隔、投与ルートを含む投与条件を検討し、適切な予防または治療効果を得られる条件を決定することができる。同様に、II型IFN受容体リガンドの臨床適用のための詳細な投与条件を決定するには、（a）破骨細胞形成を誘導し得る条件で破骨細胞前駆細胞にII型IFN受容体リガンドを接触させる工程工程、（b.）（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収を検出する工程、を含むII型IFN受容体リガンドの効果を検出する方法を用いることができる。具体的には、本明細書に記載された方法を利用して実施することができる。

また、本発明は、II型IFN受容体リガンド、または該リガンドを発現するベクタ

一を含む、破骨細胞形成シグナルの制御に用いられる薬剤に関する。本発明は、II型IFN受容体リガンド、または該リガンドを発現するベクターを含む、以下の薬剤を提供する。

- (a) 破骨細胞形成抑制剤
- (b) RANKLシグナル伝達抑制剤
- (c) TRAF6抑制剤
- (d) 骨破壊抑制剤

II型IFN受容体リガンド、および該リガンドを発現するベクターは、先に記載したものをを用いることができる。本発明において薬剤には、試薬および医薬が含まれる。これらの薬剤は、リガンドやベクター自体を用いる他、滅菌水、生理食塩水、緩衝剤、塩、安定剤、保存剤、界面活性剤、他の蛋白質（BSAなど）、トランスフェクション試薬（リポフェクション試薬、リポソーム等を含む）等と適宜組み合わせる組成物としてもよい。これらは混ぜ合わさっていてもよく、使用時に混合されるまで分離されていてもよい。本発明の薬剤は、破骨細胞形成を抑制する作用を有すること、RANKLシグナル伝達を抑制する作用を有すること、TRAF6蛋白質の発現またはその活性を抑制する作用を有すること、または骨破壊抑制を抑制する作用を有することが、該薬剤の容器、包装箱、または添付される説明書等に記載されているか、あるいは該薬剤に関連付けられていることが好ましい。関連付けられているとは、該薬剤、その容器、包装箱、または添付される説明書等から、該薬剤が上記作用を有するという情報を直接的または間接的に入手可能であることを言う。例えばこれらの薬剤の作用または用途が別途発行される印刷物に記載されていたり、あるいはウェブ上に開示されている場合などが含まれる。本発明の薬剤は、培養細胞系や個体に適用することができる。対象となる個体は、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギなどの哺乳動物、およびその他の脊椎動物が挙げられる。特に、II型IFN受容体リガンド、または該リガンドを発現するベクターを含む本発明の医薬組成物は、ヒト骨破壊疾患に対する予防薬および治療

薬として有用である。

II型IFN受容体リガンド、該リガンドを発現するベクター、または上記薬剤を医薬組成物として用いる場合は、リガンドやベクター自体を直接患者や個体に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせで製剤化して投与することが考えられる。医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。組成物におけるリガンドやベクターの含有率は適宜決定すればよい。

患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、皮下、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうるがそれらに限定されない。また、全身的または局所的に投与され得る。IFN等の薬剤の投与による全身的な副作用が問題となる場合には、局所投与により投与量を抑えることができる。投与量、投与方法は、医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。実施例に示すように、*in vitro*系において 1 U/ml の IFN- $\gamma$  が破骨細胞形成をほぼ完全に抑制した。例えば *in vivo* においても、標的とする破骨細胞前駆細胞周辺で、このような有効濃度を維持できるように薬剤の投与量を決定することができる。投与は1回から数回に分けて行うことができる。

本発明の医薬組成物は、特に炎症性骨吸収および炎症性骨破壊の防止に有用である。「炎症性骨吸収および骨破壊」とは、炎症を伴う骨吸収および骨破壊を言う。例えば関節炎においては、滑膜に含まれる滑膜マクロファージからの破骨細胞形成が促進され、パンヌスが骨へと侵入する前線領域で活発な骨吸収が起こっている。特に慢性関節炎においては、この骨吸収により長期的な関節破壊が進行す

る。本発明の医薬組成物を投与することにより、この病的骨吸収を抑制することができる。このような炎症性骨吸収を伴う関節炎としては、特に慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) を含む自己免疫性関節炎が挙げられる。慢性関節リウマチは、自己免疫性の慢性炎症性疾患であり、増殖した滑膜が活発に骨軟骨へと侵入し、多発性の関節破壊をもたらす。本発明の医薬組成物は、この関節炎性骨破壊を防止するために好適に用いられる。また、本発明の医薬組成物が適用され得る他の炎症性骨吸収としては、歯周病が挙げられる。

また、本発明の医薬組成物は、巨細胞腫、癌骨転移、および色素性絨毛結節滑膜炎 (pigmented villonodular synovitis; PVS) を含む、破骨細胞による骨吸収亢進を病態とする様々な疾患に対しても適用され得る。また、骨粗鬆症および癌の高カルシウム血症の治療への適用も期待される。さらに、Paget病、肝炎やエイズに伴う骨量減少、白血病や多発性骨髄腫に伴う骨吸収・骨破壊、人工関節周囲の骨吸収 (ルースニング) に対する予防および治療にも適用され得る。本発明の医薬組成物は、該組成物が上記に示した疾患の少なくとも1つに対して適用できることがその容器、包装箱、または添付される説明書等に記載されているか、あるいは該組成物に関連付けられていることが好ましい。本発明により、破骨細胞の形成および機能の制御による新たな治療介入が可能となる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、IFN- $\gamma$ R<sup>+/+</sup> マウスまたは IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> マウスにおける、生理食塩水またはLPSを注入された頭蓋骨の組織切片 (酒石酸耐性酸フォスファターゼ [TRAP] およびヘマトキシリンによる染色) を示す写真である。破骨細胞特異的酵素 TRAP による染色で示される破骨細胞形成の増強に注意。LPS非投与の場合、IFN- $\gamma$ R<sup>+/+</sup> マウスではTRAP陽性細胞は少数しか見られない。また IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> マウスでも、ごく少数のTRAP陽性細胞が観察される。LPS投与の場合、IFN- $\gamma$ R<sup>+/+</sup> マウスでは骨吸収が誘導され、吸収腔の骨との接触面にTRAP陽性細胞が観察される。IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> マ

ウスではIFN- $\gamma$  R<sup>+/-</sup> マウスに比べ著しく増悪した骨吸収が見られ、広範囲の骨表面に破骨細胞の侵食が見られる。海綿骨梁 (trabecular bone) 表面の1mm当たりの破骨細胞数、および破骨細胞で覆われた骨表面 (侵食表面) の割合を測定した (Chiang, C. Y. et al., Infect. Immun. 67, 4231-6 (1999))。この形態計測により、IFN- $\gamma$  R<sup>-/-</sup> マウスでは破骨細胞数と侵食表面が2倍以上増加することが判明した。

図2は、IFN- $\gamma$  によるT細胞を介した破骨細胞形成の調節を示す図である。aは活性化T細胞による破骨細胞形成の抑制を示す。抗CD3抗体で刺激した脾臓T細胞または休止T細胞を、RANKL (100ng/ml) およびM-CSF (10ng/ml) の存在下でBMMと共培養した。3日後に TRAP<sup>+</sup> 細胞を計数した。bは IFN- $\gamma$  R<sup>-/-</sup> BMMにおける、T細胞を介した破骨細胞形成の抑制の喪失を示す。IFN- $\gamma$  R<sup>-/-</sup> BMMを上記と同様に活性化T細胞または休止T細胞と共培養した。

図3は、RANKLにより誘導される破骨細胞形成およびBMM増殖に及ぼすIFN- $\gamma$  の効果を示す図である。IFN- $\gamma$  は、RANKL (100ng/ml) および M-CSF (10ng/ml) で刺激されたBMMにおける破骨細胞の形成に対しては顕著な阻害効果を示したが、M-CSF依存性の破骨細胞前駆BMMの増殖に対しては僅かな阻害作用を示した。

図4は、in vitro 破骨細胞形成系の顕微鏡像 (TRAP染色) を示す写真である。C57BL/6マウスのBMMをM-CSF (10ng/ml) 単独で培養した (上パネル)。この条件では、細胞は単核でTRAP陰性であった。RANKL (100ng/ml) および M-CSF (10ng/ml) の存在下では、BMMは高い効率でTRAP<sup>+</sup> で多核の破骨細胞に分化した (中央のパネル)。RANKL/M-CSFおよびIFN- $\gamma$  (100 U/ml) の存在下では破骨細胞形成は抑制された (下パネル)。細胞は融合しておらず単核で、TRAP陰性であった。

図5は、IFN- $\gamma$  による破骨細胞形成の抑制における IFN- $\gamma$  RとStat1の必要性を示す図および写真である。a, IFN- $\gamma$  R、Stat1、またはIRF-1を欠損したマウスに由来するBMMの破骨細胞形成におけるIFN- $\gamma$  の効果を、RANKL (100ng/ml) および M-CSF (10ng/ml) の存在下で調べた。破骨細胞数 (%) は、IFN- $\gamma$  処理した培養

中でのTRAP<sup>+</sup> 多核細胞数を、IFN- $\gamma$ を含まないコントロールの培養中での数で除して求めた。b, 野生型マウス、あるいは Stat1、IRF-9、または IRF-1欠損マウス由来のBMMsからの破骨細胞形成におけるIFN- $\gamma$  (10 U/ml) の効果の比較を示した。

図 6 は、RANKLシグナル伝達の下流のエフェクター分子に対するIFN- $\gamma$  の効果を解析した結果を示す写真である。

a はNF- $\kappa$ B活性のEMSA解析を示す。RANKL (100ng/ml) で刺激後、IFN- $\gamma$  の存在下または非存在下で24時間プレインキュベートしたBMMから核抽出液を調製し、イムノグロブリン $\kappa$ Bエンハンサー由来のNF- $\kappa$ B結合部位を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて以前に記載した通りに解析を行った (Lomaga, M. A. et al., Genes Dev. 13,1015-24 (1999))。複合体は、抗Rel A抗体 (Santa Cruz社) によりスーパーシフトが起こり (レーン7)、過剰量の非標識プローブにより複合体形成が阻害された (レーン8)。

b はJNK活性化阻害効果を示す。RANKL (100ng/ml) で刺激後、IFN- $\gamma$  の存在下または非存在下で24時間プレインキュベートしたBMMを、抗リン酸化JNK抗体および抗JNK抗体 (New England Biomed社) を用いたイムノプロットにより解析した。

c は破骨細胞の分化におけるRANKLシグナル伝達に關与する下流のエフェクター分子の発現に及ぼすIFN- $\gamma$  の効果を示す。RANKL添加後24時間おきに、BMMの全細胞溶解物を特異抗体 (Santa Cruz社) を用いたイムノプロットにより解析した。

図 7 は、初代BMMへのレトロウイルス遺伝子導入効率を示す図および写真である。感染2日後に、BMMをフローサイトメトリーにより解析し (上パネル)、イムノプロットを行った (下パネル)。TRAF6ウイルスを感染させたBMMのTRAF6蛋白質レベルは、コントロールBMMの約10倍であった。

図 8 は、IFN- $\gamma$  による破骨細胞形成阻害に及ぼすTRAF6過剰発現の効果を示す図

および写真である。レトロウイルス感染の2日後にBMM培養にRANKL/M-CSFおよびIFN- $\gamma$  (10 U/ml) を添加した。3日後、GFP陽性細胞を蛍光顕微鏡で同定し、TRAP染色を行った (左パネル)。上段はTRAP染色した細胞を示す。ウイルス非感染細胞およびEGFP発現ウイルスベクター (pMX-IRES-EGFP) 感染細胞では、TRAP陽性の破骨細胞は見られない。これに対し、TRAF6発現ウイルスベクター (pMX-TRAF6-IRES-EGFP) を感染させた細胞では多数の TRAP<sup>+</sup> 多核細胞が形成された。下段はGFPの蛍光を観察した結果を示す。ほとんどのTRAP<sup>+</sup> 多核細胞はGFP陽性であり、IFN- $\gamma$  存在下でもGFP陽性細胞の50%以上がTRAP<sup>+</sup> 多核細胞に分化した (右パネル)。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、本明細書において引用された文献は、全て本明細書の一部として組込まれる。

実験に用いたIFN- $\gamma$  R<sup>-/-</sup> マウスおよびIRF-1<sup>-/-</sup> マウスの作製は以前記載されている (Huang, S. et al., Science 259, 1742-5 (1993); Matsuyama, T. et al., Cell 75, 83-97 (1993))。これらの変異マウスと遺伝的に同一のバックグランドを持つC57BL/6マウスを野生型コントロールとして用いた。Stat1<sup>-/-</sup> マウス (Meraz, M. A. et al., Cell 84, 431-42 (1996)) はTaconic社から購入した。

#### [実施例1] IFN- $\gamma$ によるT細胞を介した破骨細胞形成の調節

エンドトキシンによる骨吸収の誘導は骨吸収モデル系として確立されており、この系において、これまでにT細胞が重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Ukai, T. et al., J. Periodontal. Res. 31, 414-22 (1996); Chiang, C. Y. et al., Infect. Immun. 67, 4231-6 (1999))。この骨吸収モデル系を利用して、IFN- $\gamma$  受容体 (IFN- $\gamma$  R) の成分の1つであるIFNGR1を欠損したマウス (IFN- $\gamma$  R<sup>-/-</sup> マウス) (Huang, S. et al., Science 259, 1742-5 (1993)) における破骨

細胞形成を解析した。7～8週齢の  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  マウスおよび  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{+/+}$  マウス ( $n=10$ ) の頭蓋冠に、リポ多糖 (LPS) (Sigma社) を 25mg/kg-体重で局所投与し、5日後に安楽死させ以前の記載 (Chiang, C. Y. et al., Infect. Immun. 67, 4231-6 (1999)) に従って解析を行ったところ、破骨細胞形成の増強と骨破壊の顕著な増悪化が起こることが判明した (図 1)。この観察結果から、T細胞を介した過程が関与する骨組織の維持に、 $\text{IFN-}\gamma$  が重要な機能を持っていることが示唆された。

$\text{IFN-}\gamma$  産生T細胞が破骨細胞形成に及ぼす影響を調べるため、次に活性化T細胞または休止脾臓T細胞と骨髓単球・マクロファージ系前駆細胞 (bone marrow monocyte/macrophage precursor cells; BMMs) との *in vitro* 共培養系において、M-CSF存在下でRANKLで刺激する実験を行った。

*in vitro* 破骨細胞形成を観察するため、非接触性骨髓細胞 (24穴プレートの1ウェル当たり  $5 \times 10^5$  細胞) を 10ng/ml の M-CSF (R&D社) を含む  $\alpha$ -最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM) で2日間培養し、BMMとして用いた。これらのBMMは 100ng/ml の可溶性RANKL (Peprotech社) および 10ng/ml の M-CSF の存在下でさらに3日間培養し破骨細胞を形成させた。多核細胞の観察は以前記載したように行った (Yasuda, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95, 3597-602 (1998))。T細胞の活性化のため、精製  $\text{CD3}^+$  脾臓細胞 (>93%) を RPMI1640 で培養し、 $5 \mu\text{g/ml}$  の抗  $\text{CD3} \epsilon$  抗体 (PharMingen社) で1日間刺激した。活性化T細胞またはT細胞培養上清の添加は、BMM培養へのRANKLの添加と同時にを行った。培地は48時間おきに交換した。

図 2 aに示すように、抗CD3抗体で活性化させたT細胞と共に共培養した場合には、BMMの破骨細胞形成は強く阻害されたが、休止T細胞では阻害されなかった。この条件では、ほとんどのBMMは成熟マクロファージに分化した。活性化T細胞を、 $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  のBMMと共培養しRANKLで刺激した場合には、活性化T細胞の抑制効果は完全に失われた (図 2 b)。これらの  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  BMMは、活性化T細胞の共培養において、組み換えRANKLが存在しなくても低い効率で破骨細胞に分化したことから、破骨細胞形成に対するT細胞の効果は、RANKLと  $\text{IFN-}\gamma$  のバランスに依存している



ことが示唆される。活性化T細胞の培養上清は、組み換えRANKLによる破骨細胞形成を抑制する作用を示し、この抑制効果はIFN- $\gamma$ に対する抗体により中和されることが確認された。これらの結果から、IFN- $\gamma$ はRANKLにより誘導される破骨細胞形成のT細胞による抑制にとって必須であることが示された。

〔実施例2〕 RANKLにより誘導される破骨細胞形成における、IFN- $\gamma$ のStat1活性化経路を介した抑制

上記のRANKL刺激によるBMMの破骨細胞形成の *in vitro* アッセイ系に組み換えマウスIFN- $\gamma$  (Genzyme社) を添加しその効果を検証した。組み換えIFN- $\gamma$  の添加は BMM培養へのRANKLの添加と同時に行った。その結果、BMMの破骨細胞形成に対するIFN- $\gamma$  の顕著な阻害効果が観察された (図3および4)。過剰量のRANKL存在下において、極めて低いレベルのIFN- $\gamma$  が破骨細胞形成を強く阻害した (図3)。一方、RANKLではなくM-CSFに依存するBMMの増殖に対しては、IFN- $\gamma$  は比較的僅かな抑制効果を示した (図3)。さらにIFN- $\gamma$  は、M-CSF非依存性のマクロファージ細胞株 RAW264.7 のRANKLによる破骨細胞形成も阻害することが判明した。これらの結果から、IFN- $\gamma$  はRANKLシグナル伝達経路を選択的に抑制することが示唆される。細胞においてIFN- $\gamma$  のシグナルは、転写因子Stat1 (Stark, G. R. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-64 (1998)) の活性化を介して伝達される。活性型Stat1は IFN- $\gamma$  activated factor (GAF) とも呼ばれ、直接、または転写因子IRF-1 (Taniguchi, T. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1333, M9-17 (1997)) を介してIFN- $\gamma$  の標的遺伝子群の発現を誘導する。図5に示されるように、破骨細胞形成におけるIFN- $\gamma$  の阻害効果は、IFN- $\gamma$  R<sup>-/-</sup> マウスまたは Stat1<sup>-/-</sup> マウスでは完全に失われたが、IRF-1<sup>-/-</sup> マウスでは失われなかった。また、同様にIRF-9<sup>-/-</sup> マウスを用いてRANKL/M-CSFで誘導されるBMMsからの破骨細胞形成に対するIFN- $\gamma$  の効果を調べたところ、IFN- $\gamma$  の阻害効果が観察されたことから、IRF-9はIFN- $\gamma$  による阻害には必要ないことが判明した (図5b)。このことから、RANKLシグナル伝達経路の抑制には、Stat1 (GAF) を介し、IRF-1およびIRF-9に非依存的な遺

伝子誘導経路が重要であることが示された。

【実施例 3】 IFN- $\gamma$  による RANKL シグナル伝達の阻害は、TRAF6 の蛋白発現抑制を介する

RANKL がその受容体である RANK を刺激すると、RANK はアダプター蛋白質である TRAF ファミリーを誘導し、NF- $\kappa$ B および JNK 経路を活性化する (Dougall, W. C. et al., *Genes Dev.* 13, 2412-24 (1999); Hsu, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 3540-5 (1999))。TRAF ファミリーの中でも、TRAF6 は RANKL シグナル伝達に重要であることが知られており、TRAF6<sup>-/-</sup> マウスは骨吸収を行う破骨細胞が欠損し、大理石骨病の表現型を示す (Lomaga, M. A. et al., *Genes Dev.* 13, 1015-24 (1999); Naito, A. et al., *Genes Cells* 4, 353-62 (1999))。破骨細胞形成の IFN- $\gamma$  による抑制の標的を調べるため、RANKL で誘導される NF- $\kappa$ B と JNK の活性化を、IFN- $\gamma$  処理した BMM において調べた。ゲルシフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay; EMSA) の結果、RANKL で誘導される NF- $\kappa$ B の活性化は、IFN- $\gamma$  処理した BMM では顕著に阻害された (図 6 a)。さらに、RANKL で誘導される JNK の活性化も IFN- $\gamma$  により阻害された (図 6 b)。RANKL と M-CSF で刺激した BMM において、RANKL シグナル伝達経路の下流のエフェクター分子をイムノブロットで解析したところ、IFN- $\gamma$  により TRAF6 の発現が特異的かつ顕著に阻害されることが判明した (図 6 c)。この結果は、IFN- $\gamma$  による蛋白質分解系の誘導が TRAF6 の分解に関与していることを示すものである。

【実施例 4】 TRAF6 遺伝子発現による破骨細胞形成への影響

TRAF6 発現の阻害が、IFN- $\gamma$  が媒介する破骨細胞形成の抑制に重要であるかを調べるため、TRAF6 を外来的に発現させた BMM を RANKL で刺激し、IFN- $\gamma$  による破骨細胞形成の阻害を観察する実験を行った。

TRAF6 cDNA の下流に internal ribosomal entry site (IRES) - 増強緑色蛍光蛋白質 (EGFP) をコードするレトロウイルスベクター (pMX-TRAF6-IRES-EGFP) は、マウス全長 TRAF6 遺伝子の 2.0kb EcoRI-StuI 断片を pMX-IRES-EGFP (Nosaka, T.

et al., EMBO J. 18, 4754-65 (1999)) の同一部位に挿入し、以前の記載 (Nosaka, T. et al., EMBO J. 18, 4754-65 (1999)) に従って作製した。レトロウイルスのパッケージングは、これらの pMX ベクターと pPAMpsi2 (Sato, M. et al., FEBS Lett. 441: 106-110 (1998)) を293T細胞にコトランスフェクトすることにより行った。作製したレトロウイルスベクターをBMMに感染させ、フローサイトメトリーとイムノブロットによる解析を行ったところ、このTRAF6発現ウイルスと、コントロールに用いたEGFPのみを発現するウイルス (pMX-IRES-EGFP) は、効率良くBMMに遺伝子を導入できることが判明した (図7)。

次に、IFN- $\gamma$ による破骨細胞形成阻害に及ぼす、TRAF6発現の効果を検証した。レトロウイルスをBMMに感染させ、48時間後にRANKL/M-CSFおよびIFN- $\gamma$ を培地に添加した。RANKL添加の3日後に、TRAP染色および骨吸収アッセイ (Yasuda, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95, 3597-602 (1998)) により破骨細胞形成を評価した。

興味深いことに、BMMにおけるTRAF6の過剰発現は、IFN- $\gamma$ による破骨細胞形成の抑制に対して抵抗性を示した (図8)。これらの細胞では、RANKLにより誘導されるNF- $\kappa$ BおよびJNKの活性化が観察された。IFN- $\gamma$ の存在下でさえ、GFP陽性細胞の約50%が酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陽性 (TRAP<sup>+</sup>) の多核細胞に分化したことは特筆すべきである (図8)。これらの分化した細胞はカルシトニン受容体を発現し、象牙切片上で骨吸収活性を示した。これらの結果は、IFN- $\gamma$ による破骨細胞形成の抑制の少なくとも一部を、TRAF6発現の低下で説明できることを示している。

#### 産業上の利用の可能性

本発明は、これまで知られていなかったIFN- $\gamma$ と骨のホメオスタシス、すなわち破骨細胞形成の抑制による骨量の維持との間の結びつきを明らかにした。ジーンターゲットングによりIFN- $\gamma$ Rを破壊すると、炎症時の破骨細胞形成が増強され

、炎症に伴う骨破壊の増悪を引き起こす。これは、元来、抗ウイルス応答に関してその効果が確立されたサイトカインが持つ生理機能の興味深い一例である。本発明により、II型IFNシグナルを介して破骨細胞形成を抑制する方法が提供された。本発明の方法によれば、IFN- $\gamma$ の投与などのII型IFNシグナル伝達の活性化により、破骨細胞形成を抑制することが可能となる。破骨細胞形成を制御することにより、異常な骨代謝を制御することができる。本発明の方法は、自己免疫性関節炎を含む、病的骨破壊を伴う疾患を予防または治療するために有用である。

## 請求の範囲

1. 破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進または抑制する工程を含む、破骨細胞形成シグナルを制御する方法。
2. 破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進または抑制する工程を含む、下記（a）から（d）のいずれかを制御する方法。
  - （a）破骨細胞形成
  - （b）RANKシグナル伝達
  - （c）TRAF6発現またはその機能
  - （d）骨吸収
3. 破骨細胞前駆細胞におけるII型IFNシグナル伝達を促進する工程を含む、炎症性骨破壊の抑制方法。
4. II型IFNシグナル伝達がStat1を介するシグナル伝達である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。
5. II型IFNシグナル伝達の促進または抑制が、II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進または抑制である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。
6. II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進を、下記（a）または（b）に記載の工程により行う、請求項5に記載の方法。
  - （a）II型IFN受容体リガンドの投与
  - （b）II型IFN受容体リガンドを発現するベクターの投与
7. リガンドがIFN- $\gamma$ である、請求項5または6に記載の方法。
8. （1）破骨細胞形成、（2）RANKシグナル伝達、（3）TRAF6発現もしくはその機能、または（4）骨吸収に及ぼす化合物の効果を検出する方法であって、
  - （a）被検化合物を含む試料の存在下で、破骨細胞前駆細胞における RANKシグナル伝達、並びにII型IFNシグナル伝達を促進する工程、
  - （b）（1）破骨細胞形成、（2）RANKシグナル伝達、（3）TRAF6発現もしくはそ

の機能、または（４）骨吸収を検出する工程、を含む方法。

９．（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

（ａ）被検化合物を含む試料の存在下で、破骨細胞前駆細胞における RANKシグナル伝達、並びにII型IFNシグナル伝達を促進する工程、

（ｂ）（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収を検出する工程、

（ｃ）対照の条件下に比べ、該（１）破骨細胞形成、（２）RANKシグナル伝達、（３）TRAF6発現もしくはその機能、または（４）骨吸収を調節する化合物を選択する工程、を含む方法。

１０．II型IFNシグナル伝達がStat1を介するシグナル伝達である、請求項８または９に記載の方法。

１１．II型IFNシグナル伝達の促進が、II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進である、請求項８または９に記載の方法。

１２．II型IFN受容体とそのリガンドとの相互作用の促進を、下記（ａ）または（ｂ）に記載の工程により行う、請求項１１に記載の方法。

（ａ）II型IFN受容体リガンドの投与

（ｂ）II型IFN受容体リガンドを発現するベクターの投与

１３．リガンドがIFN- $\gamma$ である、請求項１１または１２に記載の方法。

１４．II型IFN受容体リガンドまたは該リガンドを発現するベクターを含む、下記

（ａ）から（ｄ）のいずれかに記載の薬剤。

（ａ）破骨細胞形成抑制剤

（ｂ）RANKシグナル伝達抑制剤

（ｃ）TRAF6抑制剤

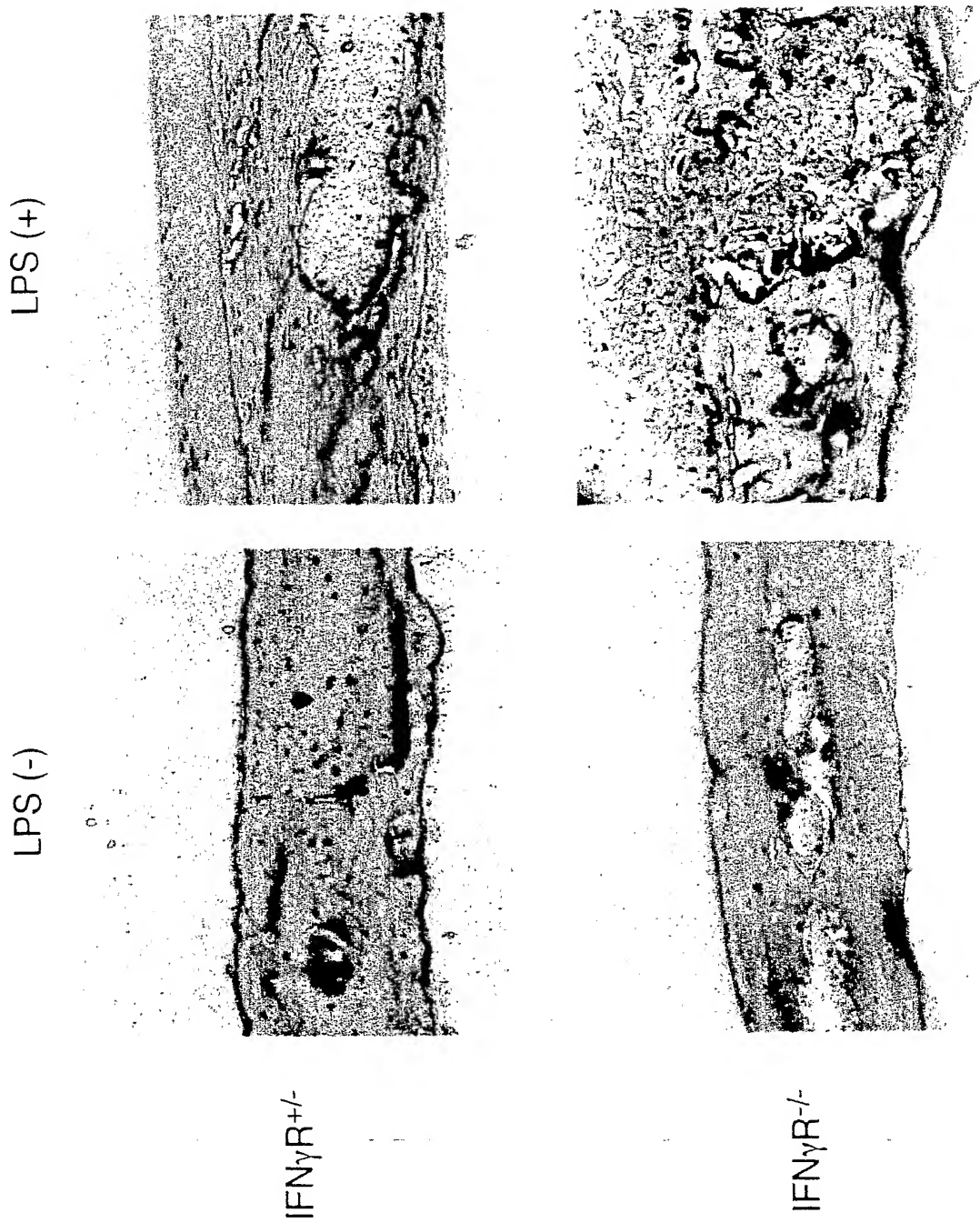
（ｄ）骨吸収抑制剤

15. II型IFN受容体のリガンドがIFN- $\gamma$ である、請求項14に記載の薬剤。

16. II型IFN受容体リガンドまたは該リガンドを発現するベクターを含む、骨破壊を抑制するための医薬組成物。

17. 自己免疫性関節炎における骨破壊の予防または治療に用いられる、請求項16に記載の医薬組成物。

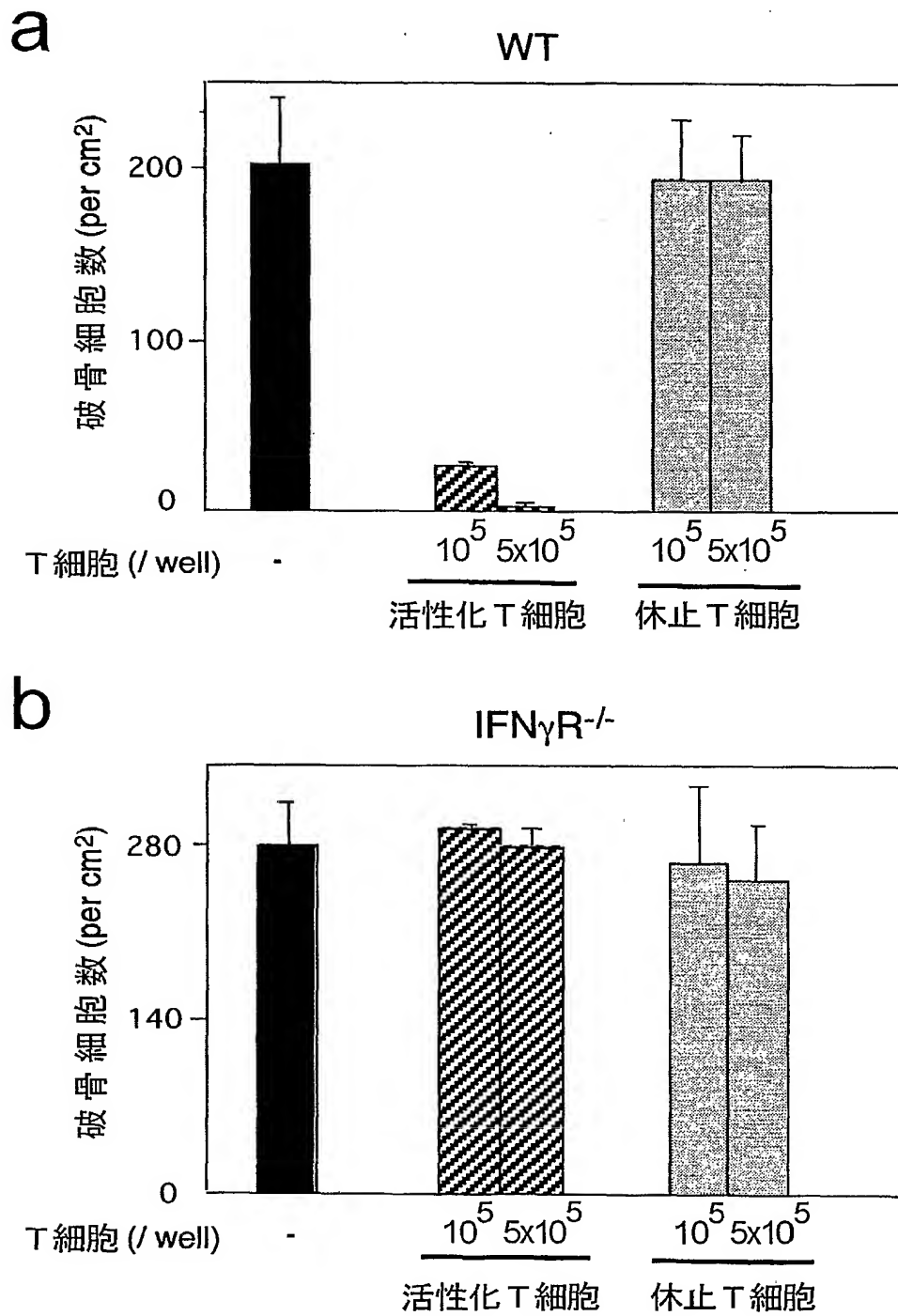
図 1





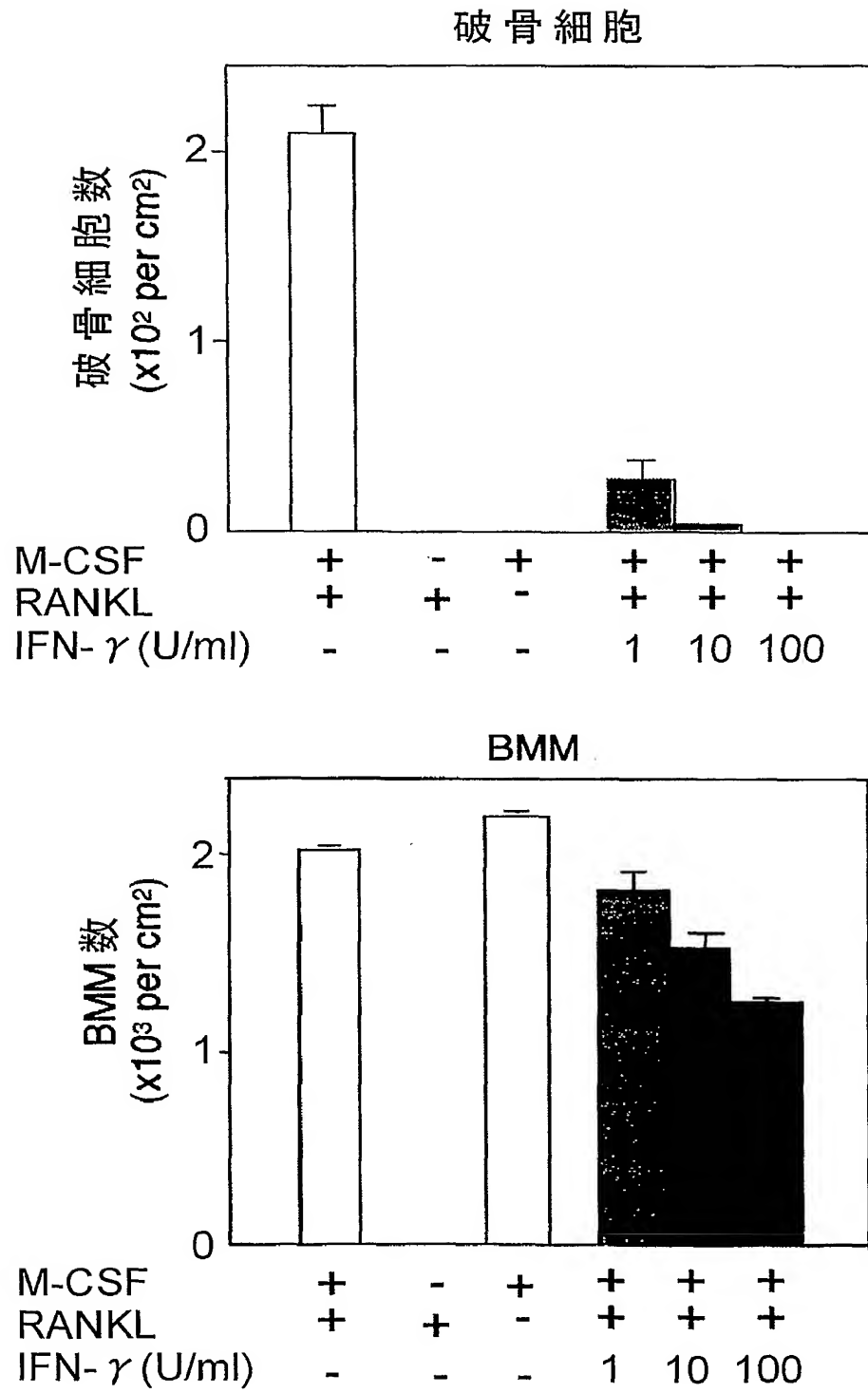
2 / 8

図 2



3 / 8

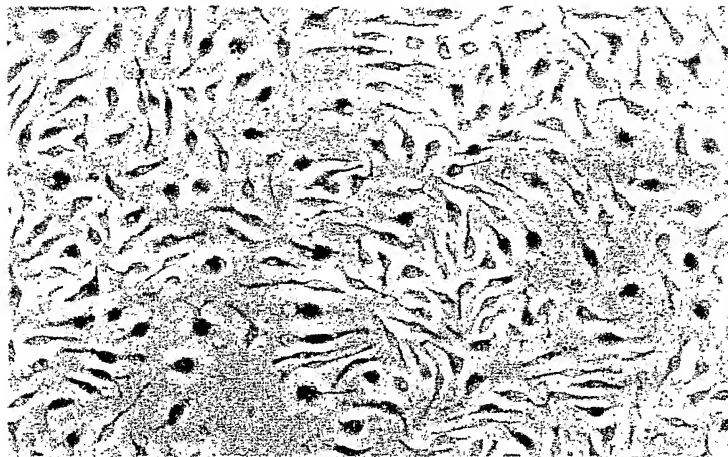
図 3



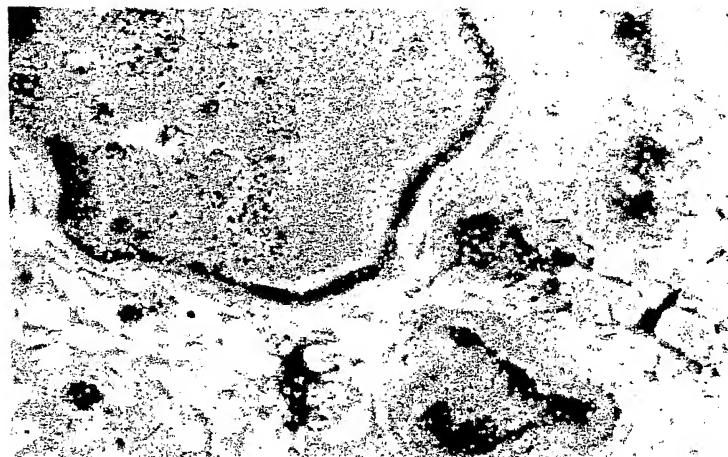
4 / 8

図 4

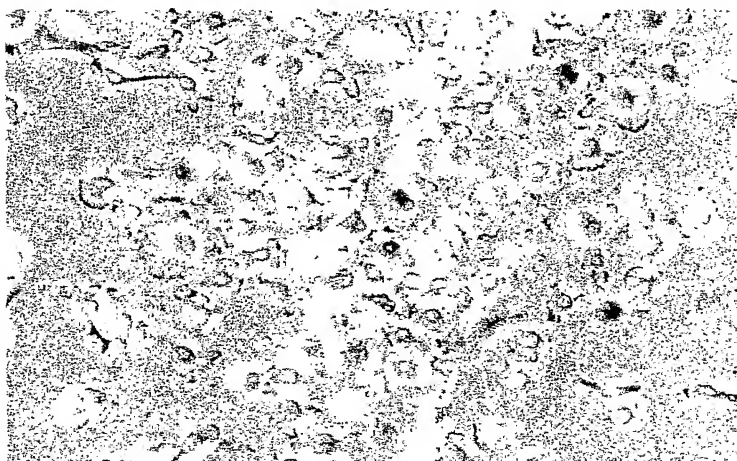
M-CSF



RANKL+M-CSF



RANKL+M-CSF+IFN- $\gamma$



5 / 8

図 5

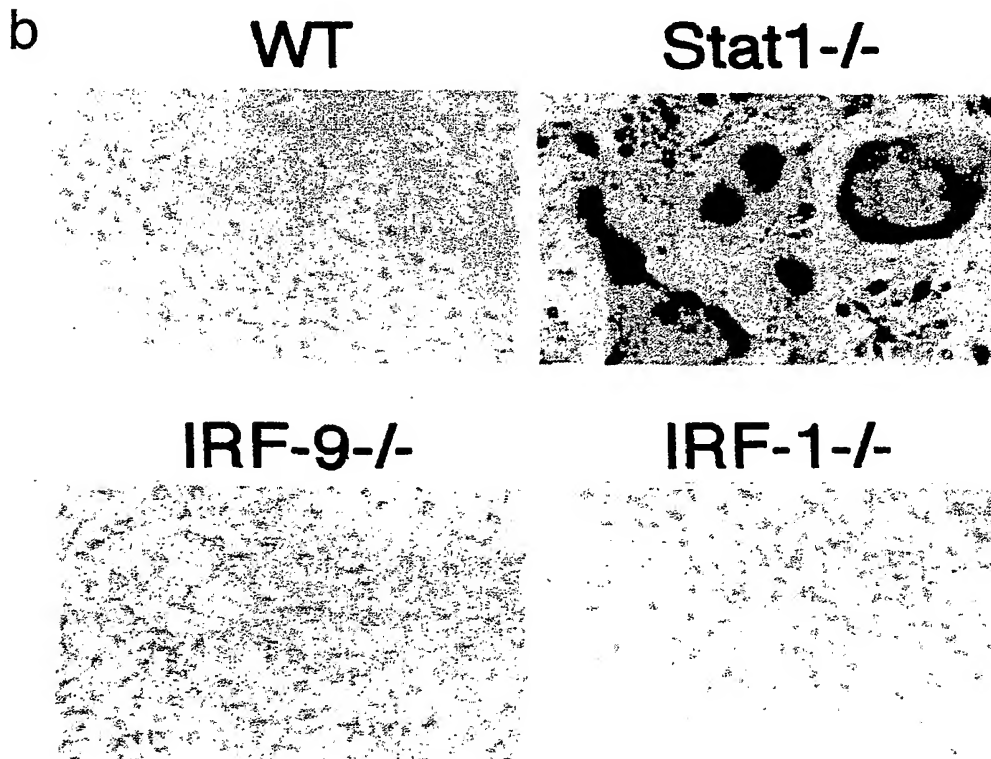
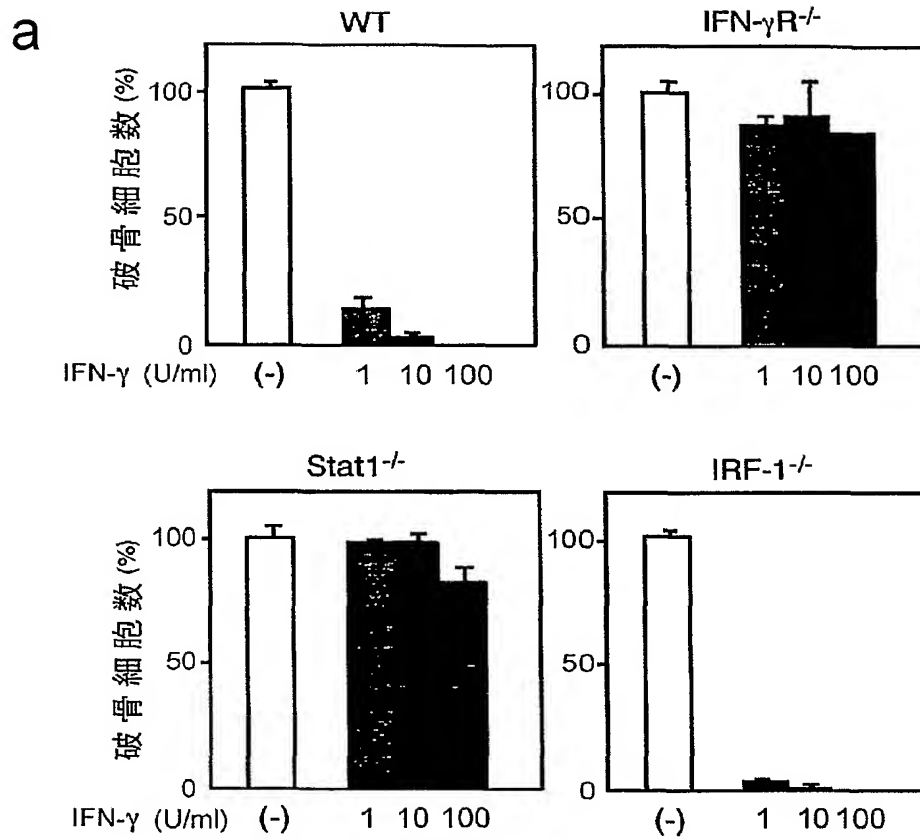
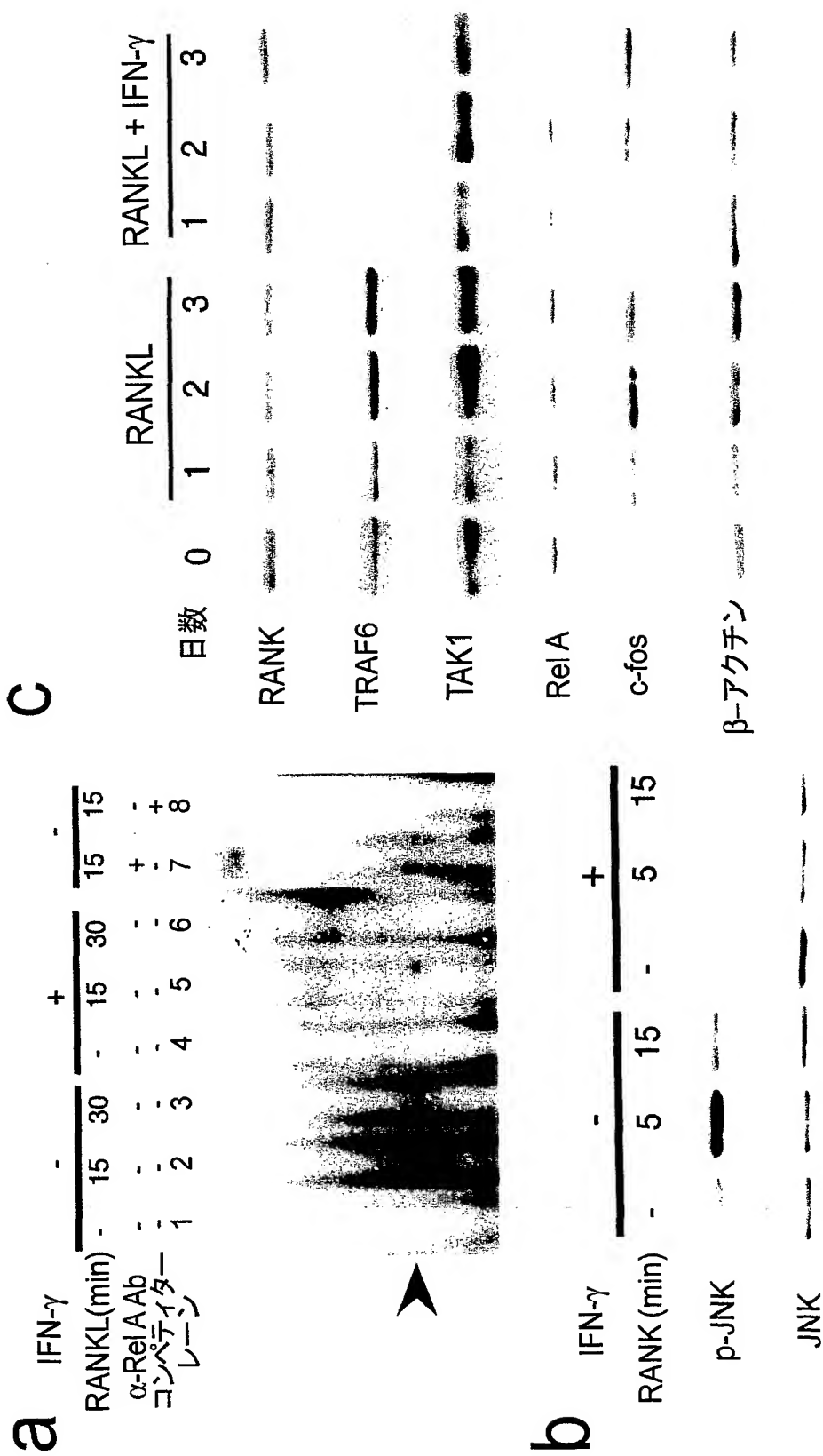


図 6

6 / 8



7 / 8

図 7

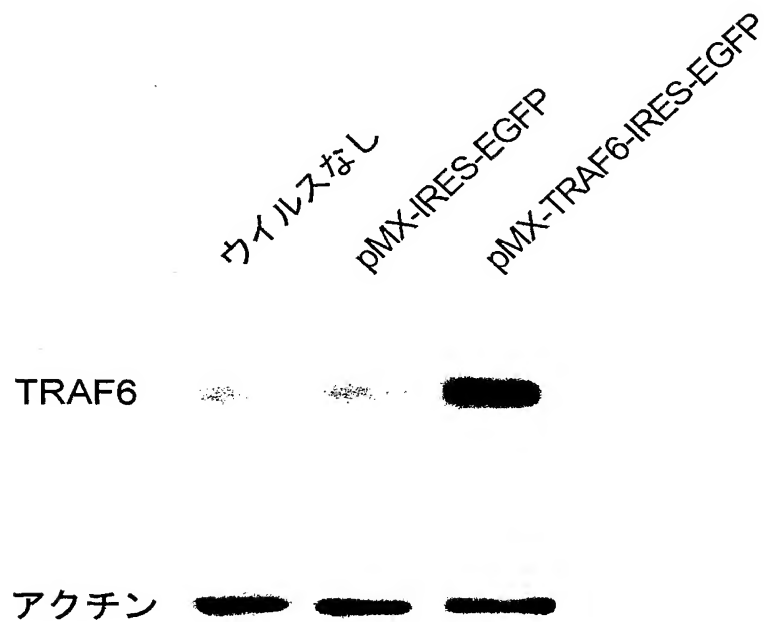
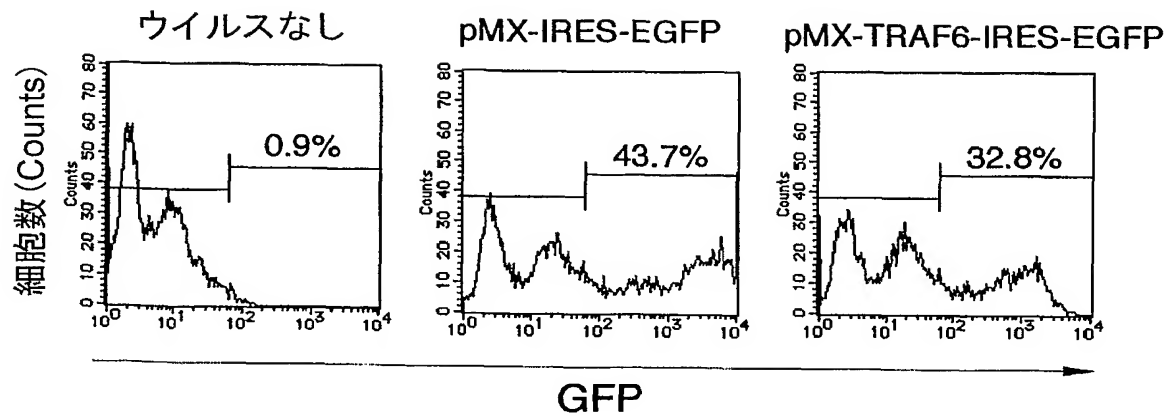
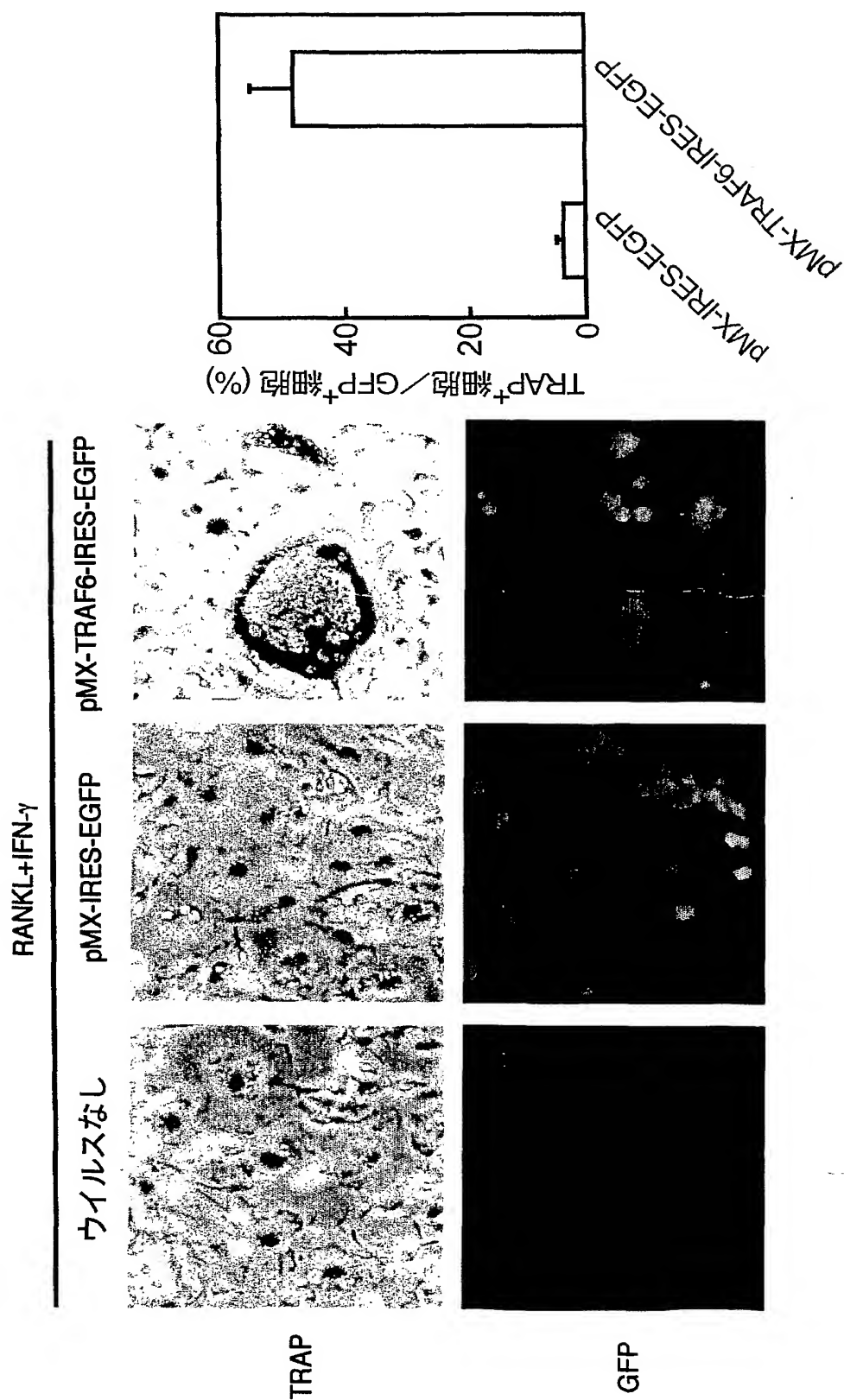


図 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08244

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/21, 35/76, A61P43/00, 19/02, 19/08, 19/10, 29/00, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/21, 35/76, A61P43/00, 19/02, 19/08, 19/10, 29/00, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKASHIMA, T. et al., "Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines", Biochem. Biophys. Res. Commun., 07 September, 2000, Vol.275, No.3, pages 768 to 775 & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.134:15660	1-17
X	EP 203580 A2 (Boehringer Ingelheim International GmbH), 03 December, 1986 (03.12.86), & US 4921697 A & DE 3519361 A1 & JP 62-12724 A & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.106:169061	14-17
X	JP 7-215893 A (Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited), 15 August, 1995 (15.08.95), (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.123:266152	14-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
11 December, 2001 (11.12.01)

Date of mailing of the international search report  
25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08244

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/04799 A1 (Toray Industries, Inc.), 13 February, 1997 (13.02.97), & EP 783891 A1 & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.126:211036	1-17
A	WO 00/15807 A1 (M & E Biotech A/S), 23 March, 2000 (23.03.00), & EP 1114166 A1 & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.132:235902	1-17
A	GALIBERT, L. et al., "The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily", J. Biol. Chem., (1998), Vol.273, No.51, pages 34120 to 34127	1-17
PX	TAKAYANAGI, Hiroshi et al., "T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ ", Nature, (London), 30 November, 2000, Vol.408, No.6812, pages 600 to 605 & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.134:146299	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08244

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

In the methods as set forth in claims 1 to 7, it is not specified whether the methods are effected *in vivo* or *in vitro*. In case of performing *in vivo*, therefore, they pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/21, 35/76, A61P43/00, 19/02, 19/08, 19/10, 29/00, C12Q1/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/21, 35/76, A61P43/00, 19/02, 19/08, 19/10, 29/00, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAKASHIMA T. et al, Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000 Sep. 7, Vol. 275, No. 3, pages 768 to 775 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 134:15660	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.12.01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

4C

9455

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 203580 A2(BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL G.M.B.H.) 3.12月.1986(03.12.86) & US 4921697 A & DE 3519361 A1 & JP 62-12724 A & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.106:169061	14-17
X	JP 7-215893 A(住友製薬株式会社) 15.8月.1995(15.08.95) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.123:266152	14-17
A	WO 97/04799 A1(TORAY INDUSTRIES INC.) 13.2月.1997(13.02.97) & EP 783891 A1 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.126:211036	1-17
A	WO 00/15807 A1(M & E BIOTECH A/S) 23.3月.2000(23.03.00) & EP 1114166 A1 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.132:235902	1-17
A	GALIBERT L. et al, The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily, J. Biol. Chem., 1998, Vol.273, No.51, pages 34120 to 34127	1-17
PX	TAKAYANAGI Hiroshi et al, T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ , Nature (London), 2000 Nov. 30, Vol.408, No.6812, pages 600 to 605 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.134:146299	1-17

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-7 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 1 乃至 7 記載の方法は、生体内、生体外を特段区別していない。したがって、生体内における場合については、治療による人体の処置方法に該当し、PCT 17 条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。